

Die Bedeutung koinhibitorischer Signale in der ZNS
Immunregulation: die Rolle des B7-Homologs B7-H1
(PD-L1)

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

vorgelegt von
Sonja Ortler
aus Ingolstadt

Würzburg 2009

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. H. Wiendl

Gutachter: Prof. Dr. W. Rössler

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

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

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

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

.....
Sonja Ortler

Würzburg, Januar 2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Das Immunsystem.....	8
1.2	Induktion einer Immunantwort	9
1.2.1	Dendritische Zellen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen	9
1.2.1.1	Klassifizierung der dendritischen Zellen	10
1.2.1.2	Antigenaufnahme und -präsentation.....	11
1.2.2	Aktivierung und Differenzierung von T-Helfer-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen	12
1.2.3	Immunregulation durch T-Zellen.....	13
1.3	Kostimulation.....	14
1.3.1	Die erweiterte Zwei-Signal-Hypothese.....	14
1.3.2	Die B7-Familie der kostimulatorischen Moleküle.....	16
1.3.2.1	B7.1/B7.2: CD28/CTLA-4	17
1.3.2.2	ICOSL:ICOS	19
1.3.2.3	B7-H1/B7-DC:PD-1	20
1.3.2.3.1	Struktur und Expression von B7-H1/B7-DC und PD-1.....	20
1.3.2.3.2	Funktion von B7-H1/B7-DC und PD-1	21
1.3.2.4	B7-H3, B7-H4, BTLA	22
1.4	Autoimmunität.....	23
1.4.1	Multiple Sklerose	24
1.4.2	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	27
1.4.2.1	Induktionsphase	28
1.4.2.2	Effektorphase.....	30
1.4.2.3	Epitop „spreading“ / Remission	31
1.5	Ziel der Studie.....	32
2	Material und Methoden	34
2.1	Material.....	34
2.1.1	Geräte.....	34
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	34
2.1.3	Chemikalien	35
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	36
2.1.5	Biochemikalien, Medien und Supplemente	37
2.1.6	Kits.....	38
2.1.7	Versuchstiere.....	38
2.1.8	Antikörper	38
2.1.8.1	Antikörper für die Durchflusszytometrie	38
2.1.8.2	Antikörper für die Histologie	39
2.1.8.3	Antikörper für die Zellkultur	39
2.1.9	Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	40
2.2	Methoden.....	40
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	40
2.2.1.1	Bestimmung der Zellzahl lebender Zellen.....	41
2.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	41
2.2.1.3	Herstellung von Einzelzellsuspensionen und Kultivierung von Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen	41
2.2.1.4	Isolierung und Kultivierung von mononukleären Leukozyten aus dem ZNS.....	42

2.2.1.5 Isolierung von Stammzellen aus murinem Knochenmark und Differenzierung zu DZ.....	42
2.2.1.6 Aufreinigung von Zellpopulationen mittels magnetischer Zellsortierung	43
2.2.1.7 Durchflusszytometrie.....	43
2.2.1.7.1 Färbung von Oberflächenmolekülen.....	44
2.2.1.7.2 Intrazelluläre Färbung.....	44
2.2.1.7.3 Aufreinigung von Zellpopulationen mittels FACS.....	44
2.2.2 <i>Ex vivo</i> Versuche.....	45
2.2.2.1 Restimulationsassay.....	45
2.2.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	45
2.2.2.3 Enzyme-linked Immunospot Technique-Assay.....	46
2.2.2.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	46
2.2.2.5 Zytokinbeadarray.....	47
2.2.2.6 Proliferationsassays.....	47
2.2.2.6.1 CFSE-/Suppressionsassay.....	47
2.2.2.6.2 ³ H-Thymidin-Inkorporationsassay.....	48
2.2.3 Histologie und Immunzytologie.....	48
2.2.3.1 Immunhistochemie	49
2.2.3.2 TUNEL-Assay.....	49
2.2.4 Tierexperimentelle Methoden.....	50
2.2.4.1 Intrazerebrale Injektion von DZ.....	50
2.2.4.2 Intravenöse Injektion von DZ.....	50
2.2.4.3 Induktion von aktiver EAE.....	50
2.2.4.4 Herstellung von Knochenmarkschimären	51
2.2.4.5 Perfusion.....	52
2.2.4.6 <i>In vivo</i> BrdU-Färbung.....	52
2.3 Statistik.....	52
3 Ergebnisse.....	53
3.1 Zur Rolle von B7-H1 auf die MOG ₃₅₋₅₅ -spezifische Immunantwort während der EAE in Peripherie und ZNS.....	53
3.1.1 Exazerbation des Krankheitsverlaufs in B7-H1 ^{-/-} Mäusen.....	53
3.1.2 Beschleunigung und Verstärkung der primären, peripheren Immunantwort in B7-H1 ^{-/-} Mäusen.....	55
3.1.3 Charakterisierung des ZNS Milieus in B7-H1 ^{-/-} Mäusen.....	58
3.1.3.1 Erhöhte Immunzellinfiltration im ZNS von B7-H1 ^{-/-} Mäusen	58
3.1.3.2 Apoptose-unabhängige Akkumulation von T-Zellen im ZNS von B7-H1 ^{-/-} Mäusen	59
3.1.3.3 Indifferenter Aktivierungsstatus ZNS-isolierter T-Zellen.....	60
3.1.3.4 Erhöhte Sekretion proinflammatorischer Zytokine im ZNS von B7-H1 ^{-/-} Mäusen.....	62
3.2 Zur Rolle von B7-H1 auf hämatogenen versus ZNS-residenten Zellen: Untersuchungen an Knochenmarkschimären	63
3.3 Zur Rolle von B7-H1 auf APZ <i>in vitro</i> : Verstärkte Zytokinsekretion und Proliferation Neuroantigen-spezifischer T-Zellen.....	65
3.4 Modulation der MOG ₃₅₋₅₅ -spezifischen Immunantwort durch intrazerebrale Applikation von APZ.....	67
3.4.1 Verstärkte Proliferation MOG ₃₅₋₅₅ -spezifischer T-Zellen durch unterschiedliche APZ <i>in vitro</i>	67
3.4.2 Differenzieller Beitrag verschiedener intrazerebraler APZ zur EAE-Pathogenese.....	68

3.4.3 Erhöhte Immunzellinfiltration und Th1-Polarisation im ZNS DZ-injizierter Mäuse	69
3.5 Zur Rolle von B7-H1 auf DZ <i>in vivo</i> : Modulation der MOG ₃₅₋₅₅ -spezifischen Immunantwort durch intravenöse Applikation tolerogener DZ	71
3.5.1 Zelloberflächen-Phänotyp TNF α - und LPS-maturierter DZ.....	71
3.5.2 Effektivere Protektion gegen EAE in wt Mäusen nach intravenösem Transfer B7-H1 defizienter TNF α -DZ	72
3.5.3 Verstärkte Aktivierung von Th2-/Tr1-Zellen durch B7-H1 ^{-/-} TNF α -DZ in der Peripherie	74
3.5.4 Reduzierte Frequenz CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ und IFN γ -produzierender Zellen im ZNS von B7-H1 ^{-/-} TNF α -DZ Empfängermäusen.....	75
3.5.5 Verstärkte Induktion peripherer CD1d-restringierter T-Zellen durch B7-H1 defiziente TNF α -DZ.....	77
3.6 Zur Rolle von B7-H1 auf DZ <i>in vivo</i> : Modulation der MOG ₃₅₋₅₅ -spezifischen Immunantwort durch intrazerebrale Applikation von DZ	80
3.6.1 Verstärkte Protektion gegen EAE in Abwesenheit von B7-H1 auf TNF α -maturierten DZ.....	80
3.6.2 Abschwächung der frühen T-Zell-Akkumulation im ZNS intrazerebral DZ-injizierter Mäuse durch TNF α -behandelte DZ.....	81
3.6.3 Verstärkte Produktion von IL-10 und reduzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach Injektion TNF α -behandelter und/oder B7-H1 ^{-/-} DZ.....	83
3.6.4 Suppression MOG ₃₅₋₅₅ -spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen durch <i>ex vivo</i> isolierte CD8 ⁺ T-Zellen aus intrazerebral DZ[B7-H1 ^{-/-}]-injizierten Mäusen.....	86
4 Diskussion	89
4.1 Rolle von B7-H1 in der Modulation adaptiver Immunantworten während der EAE.....	89
4.2 Funktionalität intrazerebraler APZ während der ZNS Autoimmunität	93
4.3 Applikation und Modulation von DZ zur Therapie von Autoimmunerkrankungen.....	95
4.3.1 B7-H1 auf tolerogenen versus immunogenen intrazerebralen DZ	96
4.3.2 B7-H1 auf tolerogenen intravenös applizierten DZ.....	99
4.4 Ausblick.....	104
5 Zusammenfassung.....	106
6 Abstract	108
7 Literaturverzeichnis.....	110
8 Anhang	130
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	130
8.2 Publikationen.....	132
8.2.1 Originalarbeiten	132
8.2.2 Tagungsbeiträge	133
8.3 Danksagung	134
8.4 Lebenslauf.....	136

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Krankheiten, die durch extrazelluläre Pathogene wie Parasiten oder Bakterien verursacht werden, aber auch vor intrazellulären Pathogenen wie Viren oder Krebszellen (Alam, 1998). Es setzt sich im Wesentlichen aus zwei Komponenten zusammen, dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem (Janeway et al., 2001). Beim angeborenen Immunsystem handelt es sich um den ersten, unmittelbaren Barriere Mechanismus des Körpers gegen Krankheitserreger, der hauptsächlich von Proteinen der Komplementkaskade, Interferonen sowie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen (DZ), Mastzellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) vermittelt wird. Diese Zellen sind in der Lage, eingedrungene Erreger zu binden, zu internalisieren und so abzutöten. Zusätzlich aktivieren Makrophagen und DZ als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) auch den adaptiven Arm der Immunantwort. Dieser unterscheidet sich vom angeborenen Immunsystem durch seine größere Effizienz, spezifische Erkennung und Abwehr von Pathogenen sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (Alam, 1998). T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen) stellen dabei die zentralen Komponenten der zellvermittelten bzw. humoralen Immunantwort dar. Bei Konfrontation mit einem Fremdanigen reagieren B-Zellen mit der Bildung spezifischer, membrangebundener oder sezernierter Antikörper, wohingegen T-Zellen über ihre hochspezifischen T-Zell-Rezeptoren (TZR) auf Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Molekülen präsentierte Antigene erkennen und eine selektive Immunantwort generieren können. MHC-Moleküle stellen eine Gruppe von hochpolymorphen Proteinen dar, die eine feste Bindung einer Vielzahl von unterschiedlichen Peptiden, deren Transport an und Präsentation auf der Zelloberfläche ermöglichen (Lipscomb and Masten, 2002).

Die zentrale Anforderung an das Immunsystem ist es jedoch, zwischen Fremd- und Selbstantigenen unterscheiden zu können, und nur bei Fremdanigenen eine Immunreaktion hervorzubringen, während Selbstantigene toleriert werden sollen. Da die Generierung der Diversität von Antigen-spezifischen T- und B-Zell-Rezeptoren durch zufällige, somatische Rekombination erfolgt, müssen anschließend autoreaktive Zellen eliminiert werden. Vermittelt wird diese Diskriminierung zwischen Fremd- und Selbstantigenen bei T-Zellen einerseits im Thymus mit der Induktion zentraler Toleranz (Anderton and Wraith, 2002; Hogquist et al., 2005). Bei der positiven Selektion werden zunächst die im Thymus reifenden T-Zellen angereichert, die Selbst-MHC:Selbst-Peptid-Komplexe erkennen. In einem zweiten

Schritt werden T-Zellen mit einer hohen Affinität zum Selbst-MHC:Selbst-Peptid-Komplex, also potenziell autoreaktive T-Zellen, negativ selektiert. Dieser Mechanismus trägt zur Aufrechterhaltung der Toleranz bei und wird zentrale Toleranz bezeichnet (Sprent and Kishimoto, 2001). Andererseits gibt es zusätzlich Mechanismen der peripheren Toleranz, durch die T-Zellen kontrolliert werden können, die die zentrale Regulation umgehen und in die Peripherie gelangen (Abbas et al., 2004). Dazu zählen

- 1) Periphere Deletion autoreaktiver T-Zellen,
- 2) Klonale Anergie, wobei T-Zellen inaktiviert werden,
- 3) Klonale Ignoranz, bei der autoreaktive T-Zellen Selbstantigen in Abwesenheit von spezifischen Aktivierungssignalen ignorieren und
- 4) Aktive Suppression durch regulatorische T-Zellen (Rocha and von Boehmer, 1991).

Zusammenfassend agieren zentrale und periphere Toleranzmechanismen an der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbstantigenen, indem sie die Generierung und Aktivierung autoreaktiver Zellen inhibieren. Gelingt dies nicht, werden autoreaktive Zellen aktiviert, sie expandieren und differenzieren zu pathogenen Effektorzellen, die eine Autoimmunerkrankung auslösen können (Jones and Diamond, 1995).

1.2 Induktion einer Immunantwort

1.2.1 Dendritische Zellen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen

Voraussetzung für die Antigen-spezifische Aktivierung von naiven T-Zellen ist eine vorherige Aufnahme, Prozessierung und Präsentation der Antigene durch professionelle APZ sowie Expression von kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche (Janeway et al., 2001). Dabei entscheidet die Qualität der APZ über die Ausrichtung der nachfolgend ausgebildeten Immunantwort. DZ erwiesen sich als die potentesten APZ bei der Aufnahme pathogener Erreger und apoptotischen Zellmaterials und stellen somit die wichtigste Komponente zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems dar (Ardavin et al., 2004; Banchereau et al., 2003; Steinman and Witmer, 1978).

Erstmals von Steinman und Cohn 1973 als Zellen mit besonders langen Fortsätzen in der murinen Milz beschrieben, entwickeln sich DZ aus CD34⁺ Vorläuferzellen des Knochenmarks (Steinman and Cohn, 1973). Aus diesen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen können verschiedene CD11c⁺ DZ-Subpopulationen differenzieren, die unter anderem in myeloide (mDZ) und plasmazytoiden (pDZ) DZ klassifiziert werden. Die bisherige Annahme, dass sich mDZ und pDZ getrennt voneinander entwickeln, musste durch neuere Untersuchungen revidiert werden (Chicha et al., 2004; Diao et al., 2004; Traver et al., 2000).

Außerdem erfolgt die Einteilung der heterogenen Gruppe der DZ anhand ihrer exprimierten Oberflächenmoleküle oder sezernierten Zytokine. Diese Faktoren bestimmen auch ihre funktionellen Eigenschaften sowie ihren Reifegrad.

1.2.1.1 Klassifizierung der dendritischen Zellen

Im normalen Organismus in den lymphatischen oder peripheren Organen zirkulierende DZ befinden sich zumeist in einem unreifen („immaturen“) Zustand. Aus einer Knochenmarksvorläuferzelle durch Stimulation mit GM-CSF, IL-3, Flt3L und IL-4 hervorgegangen, zeichnen sie sich durch eine hohe Phagozytosefähigkeit und niedrige Expression von kostimulatorischen Molekülen aus. Darüberhinaus können DZ über Makropinozytose extrazelluläre Flüssigkeiten und darin gelöste Stoffe, über rezeptorvermittelte Endozytose selbst piko- und nanomolare Mengen an Antigenen aufnehmen (Banchereau and Steinman, 1998). Aufgrund spezifischer Chemokinrezeptoren wie CCR1 und CCR6 können unreife DZ in entzündete Gewebe einwandern (Matsui et al., 2001). Dort erkennen sie über „toll-like“ Rezeptoren mikrobielle Komponenten wie LPS, Peptidoglykane oder virale RNA/DNA (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Endogene Signale, die über die TNF Rezeptor-Familie vermittelt werden oder ein proinflammatorisches Milieu mit $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-6 und IL-1b können eine Ausreifung induzieren. Während des Reifungsprozesses verändern sich DZ morphologisch, phänotypisch und funktionell. Anders als im unreifen Zustand können ausreifende DZ keine weiteren Antigene mehr internalisieren und prozessieren (Dudziak et al., 2007). Stattdessen erhöhen sie den Anteil an MHC-Molekülen, insbesondere MHC II, und verstärken so die Präsentation von antigenen Strukturen auf ihrer Oberfläche (Pierre et al., 1997). Nach ihrer Aktivierung wandern DZ von peripheren Organen in lymphatische Gewebe wie Milz und Lymphknoten ein, wo sie den Reifungsprozess abschließen, B- und T-Zellen durch Chemoattraktion anlocken und die Überlebensfähigkeit von zirkulierenden T-Zellen aufrechterhalten (Adema et al., 1997; Brocker, 1997). Gesteuert wird diese Migration unter anderem von den Chemokinliganden CCL19 und CCL21, die einen Chemokingradienten bilden und so über Wechselwirkung mit CCR7 DZ in lymphatische Gewebe dirigieren (Martín-Fontecha et al., 2003). Reife DZ besitzen außerdem die Fähigkeit, IL-12 zu produzieren (Macatonia et al., 1995; Trinchieri, 1995). Adhäsionsmoleküle wie CD54 und Kostimulationsmoleküle wie CD80, CD86 und CD40 werden in reifen DZ hochreguliert, um die Ausbildung eines direkten Zell-Zell-Kontakts zwischen DZ und T-Zellen zu ermöglichen (Setum et al., 1993). Mit Ausbildung dieser immunologischen Synapse findet schließlich die terminale Ausdifferenzierung der DZ statt, indem sie ein stimulatorisches oder regulatorisches Signal an T-Zellen vermitteln (Friedl et al., 2005). Da in den efferenten Lymphbahnen keine

DZ gefunden werden konnten, vermutet man, dass die DZ nach der terminalen Differenzierung in den sekundären lymphatischen Organen absterben.

„Semi-mature“ DZ sind DZ, die sich in einer Zwischenphase zwischen dem ruhenden, unreifen und dem voll ausgereiften, migrationsfähigen Stadium befinden (Lutz and Schuler, 2002). Ähnlich wie voll maturierte DZ tragen auch semi-mature DZ eine hohe Anzahl von MHC II und kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche, produzieren jedoch nur geringe Mengen an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1b, IL-6, TNF α und IL-12p70. Letzteres stellt den wesentlichen Unterschied im Gegensatz zu voll maturierten DZ dar. *In vitro* können semi-mature DZ durch Stimulation mit TNF α generiert werden (Menges et al., 2002). Entsprechende Zellen *in vivo* wurden als lymphatisch vorkommende DZ postuliert, die von nicht-lymphoiden Organen zu den peripheren Lymphknoten migrieren und apoptotische Zellen bzw. (Selbst-) Antigene tragen (Kleindienst et al., 2005).

1.2.1.2 Antigenaufnahme und -präsentation

DZ zersetzen internalisierte Partikel zu Peptidfragmenten, die auf MHC I-Molekülen (Erkennung durch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen) oder MHC II-Molekülen (Erkennung durch CD4⁺ T-Helfer (Th)-Zellen) präsentiert werden. Endogene, intrazellulär aufgenommene Antigene werden in der APZ direkt im Proteasom abgebaut, die Fragmente ins Endoplasmatische Reticulum geleitet und dort an MHC I-Moleküle gebunden (Lipscomb and Masten, 2002). Diese beladenen MHC I-Moleküle werden von zahlreichen Zellen auf der Oberfläche in unterschiedlicher Menge exprimiert. Für DZ einzigartig ist dagegen ihre Fähigkeit zur Kreuzpräsentation, d.h. sie können auch über Endozytose aufgenommene Antigene an MHC I-Molekülen präsentieren. Auf diese Weise können im Organismus zytotoxische T-Zellen gegen Antigene gebildet werden, die selbst nicht endogen vorkommen wie z.B. Fragmente von Tumorzellen oder intrazellulär angesiedelte Pathogene. Exogene Antigene werden über Endosomen in die APZ eingeschleust, wo sie dann bei niedrigem pH-Wert durch Proteasen zerkleinert werden. Durch Vesikelfusion mit freien Vesikeln, die MHC II-Moleküle enthalten, gelangen die Peptidfragmente an die Oberfläche der APZ, wo sie CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden.

Als weitere Gruppe Antigen-präsentierender Moleküle auf myeloiden Zellen neben den MHC-Molekülen gibt es die CD1-Moleküle. Sie stellen eine Gruppe nicht-polymorpher, MHC I-ähnlicher Moleküle dar, die in den Endosomen mit Lipiden und Glykolipiden beladen werden. CD1d-präsentierte Lipidantigene aktivieren in erster Linie NKT-Zellen, eine Subpopulation von T-Zellen, die große Mengen Th1/Th2-Zytokine (IFN γ , IL-4, IL-13) sezernieren kann (Godfrey et al., 2000).

1.2.2 Aktivierung und Differenzierung von T-Helfer-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen

Der Kontakt zwischen T-Zellen und Antigen-tragenden DZ findet nach Einwanderung der APZ in lymphatische Organe in den T-Zell-Arealen statt. Dort können naive T-Zellen über ihren jeweils spezifischen TZR passende Antigene auf der Oberfläche von DZ detektieren. Unter entsprechender Rekrutierung kostimulatorischer Moleküle und dem passenden Zytokinmilieu können T-Zellen durch DZ aktiviert werden und zu Differenzierung, Proliferation und Polarisation einer T-Zellantwort angeregt werden.

Nach ihrer Aktivierung differenzieren $CD4^+$ T-Zellen zu verschiedenen Th-Zellen mit jeweils unterschiedlichem Zytokinprofil aus. Th1-Zellen sind durch ihre Sekretion von hauptsächlich proinflammatorischen Zytokinen wie $IFN\gamma$, IL-12 und $TNF\alpha$ charakterisiert, während Th2-Zellen vornehmlich IL-4, IL-5 und IL-10 produzieren (Mosmann and Coffman, 1989). IL-12 spielt eine wichtige Rolle für die Induktion der Th1-Differenzierung, und Th1-Zellen initiieren wiederum Phagozyten-vermittelte Abwehrreaktionen gegen Infektionen und mediieren die Reifung von $CD8^+$ T-Zellen in Killerzellen. Th2-Zellen rekrutieren Eosinophile und stimulieren die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen. Th1- und Th2-Zytokine sind gegenseitig regulatorisch und können den Verlauf von Autoimmunerkrankungen wesentlich beeinflussen (Lafaille et al., 1997; Steinman et al., 2002). Neben diesen klassischen zwei Subtypen von Th-Zellen, die von Mosmann et al. mit dem Th1/Th2-Paradigma postuliert wurden, sprechen neuere Daten für die Existenz einer weiteren Th-Zell-Subpopulation, die als Th17-Zellen bezeichnet wird (Cua et al., 2003; Harrington et al., 2006; Langrish et al., 2005; Mosmann and Coffman, 1989). Sie unterscheiden sich von anderen Th-Zellen durch ihre biologische Funktion, Genexpression, transkriptionelle Regulation und ihr einzigartiges, durch die Sekretion von IL-17, IL-17F, IL-21, IL-22 bestimmtes proinflammatorisches Zytokinprofil.

In Abb 1.1 ist ein allgemeines Schema der Th-Zell-Differenzierung abgebildet (Dong, 2008). Ausgehend von einer naiven T-Zelle, die sowohl über den TZR als auch über kostimulatorische Moleküle aktiviert wird, entwickelt sich je nach Zytokinmilieu eine Th1-, Th2- oder Th17-Zelle. Je nach Differenzierungstyp sezernieren diese Zellen wiederum Zytokine, die verschiedene immunregulatorische Funktionen mediieren. Während IL-6 in Kombination mit $TGF\beta$, IL-21, IL-23 und IL-1 die Entwicklung von Th17-Zellen begünstigt (Bettelli et al., 2006b; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006), können $IFN\gamma$, IL-2 und IL-4 die Differenzierung inhibieren (Bettelli et al., 2006b; Laurence et al., 2007; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006)

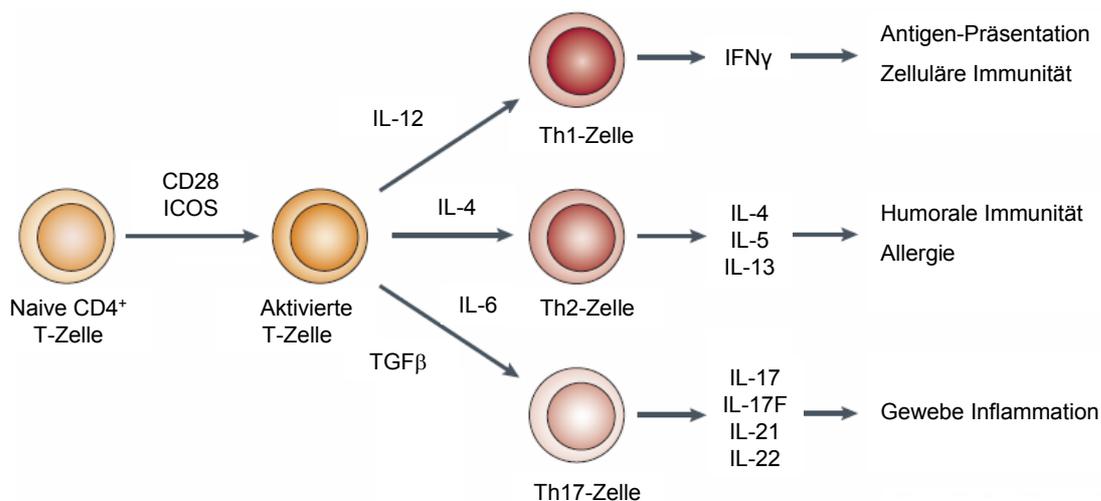


Abb. 1.1: Modell der Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen nach TZR-Stimulation und kostimulatorischen Signalen unter Einfluss unterschiedlicher Zytokine zu Th1-, Th2- bzw. Th17-Zellen. Von Th1-Zellen sezerniertes IFN γ spielt für die Antigen-Präsentation und Induktion der zellulären Immunität eine wichtige Rolle. IL-4, IL-5 und IL-13 aus Th2-Zellen regulieren B-Zell Antworten und mediieren allergische Reaktionen. Th17-Zellen mit den Signalmolekülen IL-17, IL-17F, IL-21 und IL-22 sind an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt. Abbildung adaptiert nach Dong, C., Nature Reviews Immunology, 2008

1.2.3 Immunregulation durch T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Treg) stellen einen weiteren bedeutenden Zweig des Immunsystems dar, indem sie an der Aufrechterhaltung der Toleranz gegen Selbstantigene mitwirken oder ablaufende Immunantworten modulieren. Diese inhomogene Gruppe von Zellen mit inhibitorischen Eigenschaften setzt sich aus $\gamma\delta$ T-Zellen, NKT-Zellen, CD8⁺ sowie CD4⁺ Zellen zusammen, wobei letztere am besten charakterisiert sind (La Cava et al., 2006; Najafian et al., 2003; Shevach, 2006). Man unterscheidet natürlich vorkommende, aus dem Thymus abstammende CD4⁺CD25⁺ Treg, deren Anteil etwa 5-10% der peripheren CD4⁺ T-Zellen beträgt und die zusätzlich den Transkriptionsfaktor Forkhead box P3 (FoxP3) exprimieren (Hori et al., 2003; Sakaguchi, 2005). Darüber hinaus können durch *in vitro* Antigenstimulation naive T-Zellen aus der Peripherie auch funktionell in FoxP3⁺ Treg differenzieren, wobei TGF β und IL-2 für die Induktion und Polarisation der Treg von entscheidender Bedeutung sind (Chen et al., 2003). Interessanterweise bewirkt dagegen die Kombination von TGF β und IL-6 eine Polarisation zu Th17-Zellen (Bettelli et al., 2006b; Veldhoen et al., 2006).

Eine zweite Gruppe bilden die Antigen-induzierten bzw. adaptiven Treg mit Tr1- und Th3-Zellen. Tr1-Zellen sezernieren große Mengen an IL-10, im Gegensatz dazu zeichnen sich Th3-Zellen durch hohe TGF β Produktion aus (Roncarolo et al., 2001; Weiner, 2001). Für beide Subpopulationen gilt, dass sie aus naiven, ruhenden T-Zellen nach Stimulation mit DZ

oder durch Wechselwirkung mit natürlich vorkommenden Treg generiert werden können (Enk, 2005; Stassen et al., 2004). Außerdem sind sie in der Lage, sowohl Th1- als auch Th2-Antworten zu supprimieren. Um ihre suppressiven Eigenschaften auf andere T-Zellen ausüben zu können, müssen natürlich vorkommende ebenso wie induzierte Treg über ihren TZR Antigen-spezifisch aktiviert werden, wobei ihre nachfolgende Funktionalität antigen-unspezifisch zu sein scheint (Cools et al., 2007; Suciú-Foca et al., 2003).

Die genauen Mechanismen der Suppression von Effektor-T-Zell-Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Funktionsmodulation durch Treg sind weiterhin unklar (Sakaguchi et al., 2008). *In vitro* Studien deuten auf eine Zell-Zell-Kontakt abhängige Stimulation zwischen Effektor- und Suppressorzellen hin, die über CTLA-4 und GITR vermittelt wird (Shevach et al., 2001). Ein anderer Mechanismus könnte die Modulation von DZ darstellen, welche nach CD80/CD86 Ligation durch CTLA-4 auf Tregs Indoleamin-2,3-Dioxygenase exprimieren, die wiederum T-Zell-Aktivierung reduziert und deren Deletion beeinflusst (Munn et al., 2002; Paust et al., 2004). Andere *in vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, dass insbesondere Tr1- und Th3-Zellen ihre suppressive Aktivität über lösliche Faktoren wie IL-10 bzw. TGF β vermitteln (Davidson et al., 2000; Taylor et al., 2006). Außerdem können CD4⁺CD25⁺ Tregs weiter differenzieren und über Sekretion von Granzym A/Perforin oder immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 oder IL-35 Effektor T-Zellen zerstören bzw. inaktivieren (Sakaguchi et al., 2008). Es wird vermutet, dass *in vivo* eine Kombination aus verschiedenen Mechanismen für die Suppression von Immunantworten zusammenwirkt.

1.3 Kostimulation

1.3.1 Die erweiterte Zwei-Signal-Hypothese

Die Initiierung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort findet in peripheren lymphatischen Organen statt, in denen immunogene Peptide als Antigene an MHC-Molekülen von professionellen APZ präsentiert werden. Zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen und Differenzierung zu Effektorzellen sind nach der Zwei-Signal-Hypothese ein Antigen-spezifisches und ein kostimulatorisches Signal nötig (Bretscher and Cohn, 1970). Zunächst von Bretscher und Cohn 1970 zur Erklärung der Selbsttoleranz für B-Zellen formuliert, wurde die Zwei-Signal-Hypothese von Lafferty und Cunningham 1975 auf die T-Zellen erweitert (Bretscher and Cohn, 1970; Lafferty and Cunningham, 1975). Darin wird das Antigen-spezifische Signal (Signal 1) über den MHC-Peptid-Komplex auf der APZ und den TZR sowie die Korezeptoren CD4 bzw. CD8 auf der T-Zelle vermittelt. Nur selten ist die Stärke dieses TZR-Signals ausreichend um Proliferation und Differenzierung in naiven T-Zellen zu induzieren (Viola and

Lanzavecchia, 1996). Signal 2 dient zur Signalamplifizierung und wird über zusätzliche Antigen-unspezifische, kostimulatorische Moleküle auf APZ vermittelt. Fehlt Kostimulation in Anwesenheit von Signal 1, gehen T-Zellen in einen anergen Zustand über, d.h. sie verlieren die Fähigkeit auf Antigene antworten zu können (Lenschow and Bluestone, 1993). Mangelnde Fähigkeit zur IL-2 Produktion und Proliferation beschreiben die klonale Anergie, eine Strategie um Selbsttoleranz aufrechtzuerhalten und Aktivierung autoreaktiver T-Zellen verhindern zu können (Lenschow and Bluestone, 1993). Als zusätzliches 3. Signal wird zudem die Sekretion bestimmter Zytokine wie IL-12 und IL-18 durch APZ postuliert, welche über Zytokinrezeptoren auf T-Zellen deren Polarisation zu einem Effektor-T-Zellphänotyp bewirken (Gutcher and Becher, 2007).

Neben positiven, T-Zell-aktivierenden Molekülen (Kostimulatoren) können kostimulatorische Signale auch über negative, inhibierende Moleküle (Koinhibitoren) in T-Zellen vermittelt werden. Diese verhindern Aktivierung von naiven T-Zellen, terminieren und/oder attenuieren Immunantworten und scheinen die Induktion von T-Zell-Toleranz zu vermitteln. Deswegen spielt gerade die Balance von stimulatorischen und inhibitorischen Signalen für die Qualität der Immunantwort eine Rolle, da sowohl effektive Protektion gegen Fremdanigene als auch Schutz vor Autoimmunität und Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz gewährleistet werden müssen (Chen, 2004; Greenwald et al., 2005; Sharpe and Freeman, 2002). Obwohl die Zwei-Signal-Hypothese ursprünglich für naive T-Zellen entwickelt wurde, handelt es sich bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort um einen dynamischen Prozess, in dem kostimulatorische Signale auch Antigen-erfahrene Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen beeinflussen.

Es ist heute eine Vielzahl an kostimulatorischen Molekülen bekannt, welche durch molekulare Wechselwirkungen an der APZ-T-Zell-Interaktion beteiligt sind. Dazu gehören Mitglieder der B7-Familie sowie Mitglieder der TNF/TNFR-Familie (Abb. 1.2) (Pardoll, 2002). Die Entdeckung der Interaktion von CD28 auf T-Zellen und CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf APZ jedoch war wegweisend für die Aufklärung molekularer und funktioneller Aspekte der Kostimulation.

Es wird postuliert, dass in einem Netzwerk von Signalmolekülen nicht das TZR Signal die Richtung einer Immunantwort bestimmt, sondern dass die Qualität der Immunantwort von simultan exprimierten Koinhibitoren und Kostimulatoren auf APZ oder T-Zell-Seite abhängig ist (Chen, 2004). Obwohl *in vitro* Studien zum Teil überlappende, redundante Funktionen der kostimulatorischen Moleküle zeigten, kontrolliert jeder Signalweg präferentiell einen oder mehrere Abschnitte der Aktivierung, Differenzierung und Ausreifung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen.

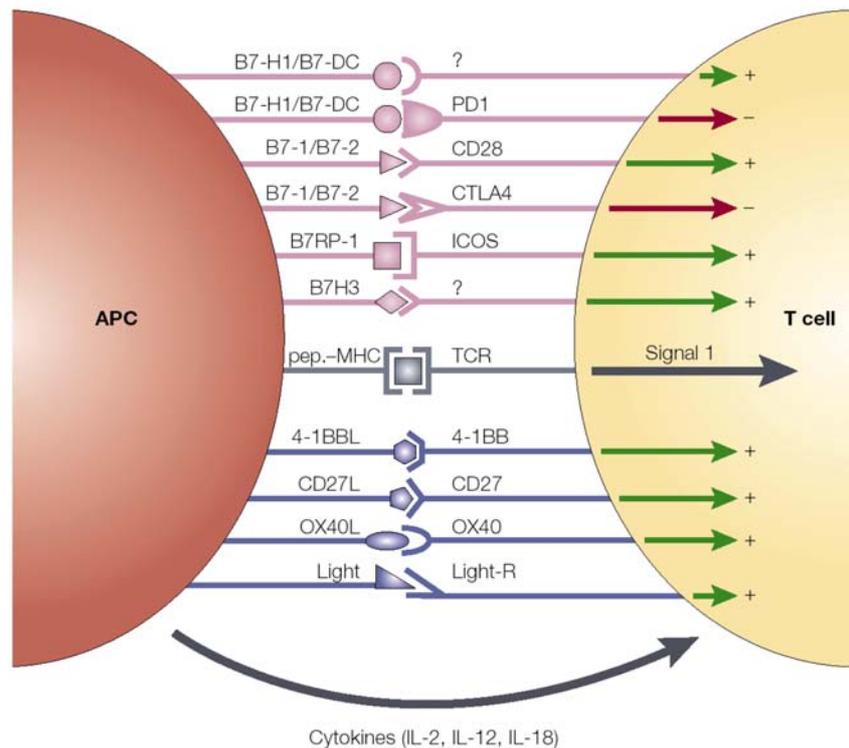


Abb. 1.2: Übersicht über die wichtigsten kostimulatorischen Moleküle bei der APZ-T-Zell-Interaktion. Neben Signal 1 von MHC-Peptid-Komplex und TZR gelten die Signale 2 (vermittelt über Kostimulation) und 3 (Zytokin-vermittelt) als entscheidende Faktoren bei der T-Zell-Modulation. Nach Pardoll, DM, Nature Reviews Immunology, 2002

1.3.2 Die B7-Familie der kostimulatorischen Moleküle

Die Wechselwirkungen zwischen Liganden auf APZ und ihren Rezeptoren auf T-Zellen ermöglichen über die Transduktion eines kostimulatorischen Signals T-Zell-Aktivierung und Expansion, während koinhibitorische Signale Immunantworten attenuieren bzw. durch zielgerichtete Termination der Immunantwort durch aggressive T-Zellen verursachte Gewebeschäden begrenzen (Clark and Ledbetter, 1994).

Der wohl wichtigste und am besten charakterisierte Signalweg in der B7-CD28 Superfamilie ist die Interaktion von B7.1/B7.2 als Liganden mit CTLA-4/CD28 auf Rezeptorseite. Er reguliert die Produktion von IL-2, Prävention von Anergieinduktion, Expansion und Differenzierung von T-Zellen (Boussiotis et al., 1993). In den letzten Jahren wurden zusätzliche Kostimulationsmoleküle und deren Regulationspotential identifiziert. Dazu gehören der ICOS:ICOSL Signalweg, der PD-1:B7-H1/B7-DC Signalweg sowie weitere Moleküle (B7-H3, B7-H4, BTLA), deren Funktionen noch nicht eindeutig geklärt sind. Strukturell stellt die B7-CD28 Superfamilie eine Untergruppe der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie dar, wobei CD28 Mitglieder eine einzige IgV-ähnliche Domäne, B7-Mitglieder mindestens eine IgV- und eine IgC-ähnliche Domäne besitzen (Sharpe and Freeman, 2002). Die Expression von Rezeptoren und Liganden variiert je nach Zelltyp und Gewebe und kann nach Aktivierung

durch APZ individuell auf-/abreguliert werden. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die verschiedenen Signalwege und ihre Funktionen gegeben werden.

1.3.2.1 B7.1/B7.2: CD28/CTLA-4

Die Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) besitzen duale Spezifität für zwei Rezeptoren, den kostimulatorischen Rezeptor CD28 und den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4 (CD152). Beide Liganden werden auf den meisten APZ-Populationen exprimiert, allerdings in unterschiedlicher Kinetik: B7.2 ist in geringen Mengen konstitutiv exprimiert und wird innerhalb weniger Stunden nach APZ-T-Zell-Interaktion hochreguliert (Walunas et al., 1994). Dagegen erfolgt die Expression von B7.1 meist induziert und erst einige Tage nach T-Zell-Aktivierung (Freeman et al., 1993; Hathcock et al., 1994). Dieses unterschiedliche Expressionsmuster führte zur Annahme, dass B7.2 das bedeutendere Molekül zur Initiation von Immunantworten durch Induktion von T-Zell-Aktivierung oder Anergie sei, während B7.1 die Aufrechterhaltung der Immunantwort durch Amplifikation oder Regulation steuert (Freeman et al., 1993). B7.1 und B7.2 besitzen beide ähnlich hohe Affinität zu CTLA-4 und im Vergleich dazu eine um etwa eine logarithmische Stufe geringere Affinität zu CD28 (Chambers, 2001; Salomon and Bluestone, 2001). Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Kinetik der Bindung: B7.2 dissoziiert aufgrund veränderter Bindungsdeterminanten schneller vom Rezeptor als B7.1, was auf wiederum unterschiedlich generierte Signale hinweist (Linsley et al., 1994). Bei der Aufklärung von *in vivo* relevanten funktionellen Aspekten der B7-Moleküle halfen Studien mit Einzel- bzw. Doppelknockoutmäusen (Borriello et al., 1997; Freeman et al., 1993). Darin konnte gezeigt werden, dass Defekte des B7.1 Moleküls die Immunantwort nur partiell treffen, da naive B7.1^{-/-} Mäuse keine phänotypischen, immunologischen Auffälligkeiten aufwiesen. Bei Stimulation mit Alloantigenen dagegen war eine dramatische Reduktion der Kostimulation in der Immunantwort zu beobachten. Bei i.v. Antigengabe in B7.2^{-/-} Mäuse dagegen konnte kein Ig-Klassenwechsel und keine Keimzentrumsformation induziert werden. Dies und die Erkenntnisse aus Doppelknockoutmäusen, welche überhaupt keine Antigen-spezifischen IgG₁ und IgG_{2a} Antworten generieren konnten, zeigen, dass B7.1 und B7.2 auf APZ zum Teil überlappende aber auch verschiedene Funktionen zur Beeinflussung von Th1- und Th2-Antworten *in vivo* haben.

Neuere Studien zeigten außerdem, dass B7.2 auf einigen ruhenden T-Zellen konstitutiv exprimiert wird und B7.1/B7.2 auf T-Zellen hochreguliert werden können. Ihre funktionelle Signifikanz auf T-Zellen ist jedoch noch weitgehend unklar.

CD28 stellt das zentrale kostimulatorische Molekül zur Aktivierung, Expansion und Differenzierung von T-Zellen dar (Coyle and Gutierrez-Ramos, 2001). Es wird konstitutiv auf T-Zellen und in geringerem Maße auch auf NK Zellen und einigen Plasmazellen exprimiert (Gross et al., 1992). Die Interaktion von CD28 und B7-Molekülen resultiert in einer Hochregulation von IL-2 und Stabilisierung von IL-2 mRNA, welche die Voraussetzung für eine IL-2 vermittelte autokrine Stimulation von T-Zellen ist (Geginat et al., 2000). Zusätzlich zum kostimulatorischen Signal wirkt CD28 synergistisch mit dem TZR, indem es die Aktivierungsschwelle durch Reduktion der für die initiale Aktivierung benötigten T-Zell-Rezeptoren um fast 50% senkt (Lanzavecchia et al., 1999). Zusätzlich wird die Immunantwort von bereits aktivierten T-Zellen durch IL-2 Produktion und deren Fortbestand optimiert (Sharpe and Freeman, 2002). CD28 verstärkt und erhält T-Zell-Antworten aufrecht, indem das Überleben, die Zytokin-vermittelte klonale Expansion und Differenzierung gefördert wird (Boise et al., 1995; Thompson et al., 1989). Somit sendet CD28 ein positives Signal an T-Zellen.

Im Gegensatz dazu ist CTLA-4 ein inhibitorischer Rezeptor auf T-Zellen, der rasch nach T-Zell-Aktivierung hochreguliert wird, mit der höchsten Expression nach etwa ein bis zwei Tagen (Perkins et al., 1996). Er bindet deutlich stärker an B7.1/B7.2 als CD28 und vermittelt ein negatives Signal in T-Zellen (Leung et al., 1995; Linsley et al., 1995). CTLA-4 inhibiert die IL-2 Synthese, führt zu Zellzyklusarrest, hemmt die Proliferation und terminiert so die Immunantwort (Krummel and Allison, 1995; Walunas et al., 1996). Knockoutmäuse spezifisch für CTLA-4 leiden an einer fatalen lymphoproliferativen Erkrankung, welche die Bedeutung von CTLA-4 zur Kontrolle von T-Zell-Antworten unterstreicht (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995). Zusätzlich scheint auch die Induktion peripherer Toleranz von der Interaktion zwischen B7.1/B7.2 und CTLA-4 und deren Effekte auf die Zellzyklusregulation abhängig zu sein (Greenwald et al., 2001).

Es ist noch unklar, wie die Signale von CD28 und CTLA-4 *in vivo* koordiniert werden. CTLA-4 könnte durch Kompetition an B7.1/B7.2, und/oder durch direkte antagonistische Wirkung auf CD28/TZR Signale in einer Zelle, und/oder durch Wechselwirkung mit B7 Molekülen auf T-Zellen und/oder durch B7.1/B7.2 auf APZ CD28-vermittelte T-Zell-Aktivierung inhibieren.

1.3.2.2 ICOSL:ICOS

Anders als B7.1 und B7.2 ist ICOSL (B7h, B7-H2, B7RP-1, LICOS) konstitutiv auch in nicht-lymphoiden Geweben wie Leber, Niere, Lunge, Peritoneum und Hoden exprimiert (Swallow et al., 1999; Yoshinaga et al., 1999). Außerdem konnte ICOSL in geringem Maße auf der Oberfläche von B-Zellen, Makrophagen, DZ, einer CD3⁺ T-Zellsubpopulation und Epithelzellen sowie Endothelzellen nachgewiesen werden (Nakazawa et al., 2004; Wiendl et al., 2003b; Yoshinaga et al., 1999). IFN γ induziert eine Hochregulation von ICOSL auf der Zelloberfläche von B-Zellen, Monozyten und DZ, allerdings scheint der Mechanismus im Gegensatz zu B7.1/B7.2 unabhängig von NF- κ B zu sein und nicht durch Vernetzung von CD40 oder Ig verstärkt werden zu können (Aicher et al., 2000). Es ist jedoch weitgehend unklar, welche funktionelle Relevanz ICOSL auf nicht-lymphoiden Geweben hat, welche Stimuli die Expression beeinflussen und welche Zelltypen für den Transfer des kostimulatorischen Signals am bedeutendsten sind.

ICOS stellt das als drittes beschriebene Molekül der CD28-Superfamilie dar, das strukturell große Ähnlichkeiten mit CD28 und CTLA-4 aufweist und vom selben Genlocus codiert wird (Hutloff et al., 1999). Das Expressionsmuster von ICOS unterscheidet sich jedoch durch die induzierte Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach TZR-/CD28-Stimulation und Zellaktivierung (Beier et al., 2000). Es konnte sowohl auf CD4⁺ Effektor- als auch Gedächtniszellen, sowie auf aktivierten NK-Zellen nachgewiesen werden (Ogasawara et al., 2002; Yoshinaga et al., 1999). Während der Differenzierung exprimieren Th1- und Th2-Zellen ICOS, jedoch persistiert das Molekül nach der initialen Aktivierungsphase länger auf Th2-Zellen (McAdam et al., 2000). Zahlreiche Studien ergaben zum Teil überlappende, aber auch distinkte Funktionen für ICOS und CD28 bei der Regulation von T-Zelldifferenzierung, Zytokinproduktion und Ig-Produktion (Sperling and Bluestone, 2001). ICOS^{-/-} Mäuse zeigten ähnlich den Effekten bei CD28-Defizienz Defekte bei Ig-Klassenwechsel und der Keimzentrumstransformation (McAdam et al., 2001). Während ausschließlich CD28 einen maßgeblichen Effekt auf die IL-2 Produktion naiver und anhaltende Proliferation kürzlich aktivierter T-Zellen hat, beeinflusst die Interaktion ICOSL:ICOS die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ , TNF α , GM-CSF durch Effektorzellen positiv (Coyle et al., 2000; Hutloff et al., 1999; Riley et al., 2001). Insgesamt vermittelt ICOS ein positives Signal in die Zelle und scheint eher für die Regulation der Zytokinproduktion von kürzlich aktivierten T-Zellen und Effektorzellen eine Rolle zu spielen als für deren initiale Aktivierung.

1.3.2.3 B7-H1/B7-DC:PD-1

Ein weiterer Signalweg in der B7-CD28 Superfamilie besteht aus den Liganden B7-H1 (PD-L1, CD274) und B7-DC (PD-L2, CD273), die beide an den Rezeptor PD-1 (CD279) binden.

1.3.2.3.1 Struktur und Expression von B7-H1/B7-DC und PD-1

PD-1 (Programmed cell death-1) wurde 1992 aus einer dieses Molekül aufgrund apoptotischer Stimuli überexprimierenden Thymus-T-Zelllinie isoliert (Ishida et al., 1992). Strukturanalysen ergaben 23% Aminosäuresequenzhomologie mit CD28 und zeigten das Vorhandensein von einer einzigen IgV-ähnlichen Domäne in der extrazellulären Region des 50-55 kDa großen Typ I Transmembranproteins. Es liegt sowohl löslich als auch membran-gebunden als Monomer vor, da dem Molekül ein membranaher Cysteinrest fehlt, der bei anderen Mitgliedern der CD28-Superfamilie Homodimerisierung ermöglicht (Zhang et al., 2004). Während des T-Zellreifungsprozesses im Thymus ist PD-1 vornehmlich auf doppelt negativen $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen detektierbar (Nishimura et al., 2000). Außerdem ist PD-1 auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, NKT-Zellen, B-Zellen und aktivierten Monozyten induzierbar (Chen, 2004; Greenwald et al., 2005; Okazaki and Honjo, 2006; Sharpe et al., 2007). Kürzlich konnte das Molekül auch im Zytoplasma von regulatorischen T-Zellen lokalisiert werden (Raimondi et al., 2006). Dieses ausgedehnte Expressionsspektrum unterscheidet sich von den anderen CD28-ähnlichen Molekülen der Familie, deren Expression auf T-Zellen beschränkt ist, und lässt auf die Regulation eines breiteren Spektrums von Immunantworten schließen.

Auch der Ligand B7-H1 zeigt ein vielfältiges Expressionsmuster mit der konstitutiven Expression auf T-Zellen, B-Zellen, DZ, Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen und Mastzellen, wobei das Level an B7-H1 durch Stimulation noch erhöht werden kann (Augello et al., 2005; Nakae et al., 2006; Yamazaki et al., 2002). Auch auf nicht-lymphoiden Zellen wie vaskulären Endothelzellen, Epithelzellen, Muskelzellen, in Geweben von Pankreas, Herz und Lunge sowie bei „immunprivilegierten“ Organen in Plazenta und Auge konnte B7-H1 nachgewiesen werden (Ishida et al., 2002; Liang et al., 2003; Rodig et al., 2003; Wiendl et al., 2003a; Wintterle et al., 2003). Darin unterscheidet sich B7-H1 deutlich von B7-DC, das auf ruhenden Zellen selten und auf induzierten T- und B-Zellen kaum zu detektieren ist. B7-DC kann insbesondere durch Zytokin-vermittelte Stimulation auf Makrophagen, DZ und aus Knochenmark differenzierten Mastzellen exprimiert werden (Lu et al., 2006; Yamazaki et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass auf Makrophagen B7-DC präferentiell durch IL-4, B7-H1 jedoch durch IFN γ induziert wird, was auf eine unterschiedliche Regulation von Th1-

und Th2-Antworten hindeutet (Loke and Allison, 2003). Strukturell weisen B7-H1 und B7-DC hohe Ähnlichkeiten auf: Sie sind beide Typ I-Transmembranglykoproteine mit einer IgC- und IgV-ähnlichen Extrazellulärdomäne, besitzen 40% Aminosäuresequenzidentität und sind mit nur 22kb Abstand auf dem selben Chromosom lokalisiert. Studien mit dimerisierten Fusionsproteinen zeigten für B7-DC zwei- bis sechsfach höhere Affinität zu PD-1 als B7-H1 (Zhang et al., 2004).

Insgesamt spricht das breite Expressionsmuster von PD-1 und insbesondere B7-H1 auch auf nicht-lymphoiden Zellen für eine Rolle des B7-H1/PD-1-Signalwegs bei der Regulation autoreaktiver T- und B-Zellen in peripheren Organen und/ oder der Kontrolle von inflammatorischen Antworten in den Zielorganen der Immunantwort.

1.3.2.3.2 Funktion von B7-H1/B7-DC und PD-1

Zahlreiche *in vitro* Studien beschäftigten sich mit der Rolle von PD-1 und seinen Liganden bei der T-Zell-Aktivierung, die genauen Funktionen sind jedoch bis heute unklar. Initiale Experimente mit immobilisierten B7-H1- und B7-DC-Fusionsproteinen und geringem CD3-Stimulus zeigten verstärkte Aktivierung ruhender T-Zellen, erhöhte Proliferation und vermehrte Produktion von IL-10 und GM-CSF, jedoch keine Effekte auf IL-2 und IL-4 Sekretion (Dong et al., 1999; Tamura et al., 2001; Tseng et al., 2001). Während diese Ergebnisse auf überlappende, stimulatorische Funktionen von B7-H1 und B7-DC bei der Generierung von T-Zell-Antworten hinweisen, deckten andere Studien eine inhibitorische Regulation von B7-H1 und B7-DC auf. So zeigten Carter et al. ebenfalls mit B7-H1/B7-DC-Ig, dass die Proliferation und Zytokinsekretion von ruhenden und präaktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Kultur deutlich reduziert war (Carter et al., 2002). Zusätzliche Studien mit B7-H1 bzw. B7-DC und MHC II-überexprimierenden Zellen bestätigten eine inhibitorische Rolle der PD-1-Liganden (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001).

In vivo jedoch zeigen Studien mit blockierenden Antikörpern und Knockoutmäusen die wesentlichen inhibitorischen Funktionen des PD-1/B7-Signalwegs. Am deutlichsten wurde die Signifikanz von PD-1 für die Regulation von T-Zell Toleranz und Autoimmunität zunächst am Phänotyp der PD-1^{-/-} Maus. PD-1 Defizienz bei C57BL/6 Mäusen führte bei etwa 50% der Tiere zur späteren Entwicklung von progressiver Arthritis und Lupus-ähnlicher Glomerulonephritis, während Mäuse auf dem Balb/c Hintergrund erweiterte Kardiomyopathie mit 50% Letalität entwickelten (Nishimura et al., 1999; Nishimura et al., 2001). Im Gegensatz dazu wiesen B7-H1^{-/-} und B7-DC^{-/-} Mäuse außer beeinträchtigter fetomaternaler Toleranz bei Abwesenheit von B7-H1 keine phänotypischen Auffälligkeiten auf (Guleria et al., 2005). Im Tiermodell EAE konnte zudem mittels Gabe spezifischer Antikörper gegen PD-1, B7-H1 und

B7-DC deren inhibitorische Funktion auf autoreaktive T-Zellen dargestellt werden (Salama et al., 2003). EAE-Studien mit entsprechenden Knockoutmäusen bestätigten diese Ergebnisse (Khoury and Sayegh, 2004; Latchman et al., 2004; Zhu et al., 2006). Darüber hinaus reguliert der PD-1/B7-Signalweg über DZ-T-Zell-Interaktion die Induktion protektiver Immunität oder Aufrechterhaltung der Toleranz. Während *in vivo* Expression von Viruspeptidepitopen auf ruhenden DZ zu keiner Stimulation von wt CD8⁺ T-Zellen führte, resultierte der DZ-T-Zellkontakt mit PD-1^{-/-} CD8⁺ T-Zellen in deren Aktivierung (Probst et al., 2005). In einer weiteren Studie zu pathogenen CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen konnte gezeigt werden, dass Überexpression von B7-H1 auf MOG-präsentierenden DZ den Verlauf der EAE mildert und die Infiltration von Immunzellen im ZNS reduziert (Hirata et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass B7-H1/B7-DC:PD-1-Interaktionen großen Einfluss auf die Qualität einer Immunantwort haben. Sie regulieren nicht nur während der initialen Aktivierungs- und Expansionsphase autoreaktive T-Zellen, sondern limitieren auch den nachfolgenden Gewebeschaden durch Attenuierung der T-Zell-Effektorfunktion im Zielorgan. B7-H1 spielt dabei besonders durch seine Expression auf nicht-hämatopoetischen Zellen eine Schlüsselrolle in der Vermittlung von peripherer Toleranz und Regulation von T-Zell-Effektorantworten (Keir et al., 2006; Martin-Orozco et al., 2006).

1.3.2.4 B7-H3, B7-H4, BTLA

Neu entdeckte Mitglieder der B7-Familie sind B7-H3 (B7-RP-2, CD276) und B7-H4 (B7x, B7S1). B7-H3 wird auf humanen myeloiden DZ exprimiert, durch Stimuli wie GM-CSF, LPS und PMA/Ionomycin kann zudem die Expression auf Monozyten, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen induziert werden (Chapoval et al., 2001). Im Maussystem konnte B7-H3 auf DZ, B-Zellen und Makrophagen nach LPS Stimulation nachgewiesen werden (Suh et al., 2003). B7-H4 dagegen scheint nicht auf humanen, frisch isolierten Zellen exprimiert zu sein, ist jedoch durch *in vitro* Stimulation auf T-Zellen, B-Zellen, DZ und Monozyten induzierbar (Prasad et al., 2003; Sica et al., 2003; Zang et al., 2003). Murin konnte eine konstitutive Expression auf B220⁺ B-Zellen und induzierbare Expression auf Peritonealmakrophagen und einigen CD11c⁺ DZ gezeigt werden. Fusionsproteine für B7-H3 und B7-H4 binden an einen bis dato unbekanntem Rezeptor auf aktivierten, jedoch nicht auf ruhenden oder naiven T-Zellen (Suh et al., 2003). Funktionelle *in vitro* und *in vivo* Studien deuten sowohl auf eine stimulatorische als auch inhibitorische Rolle von B7-H3 hin (Chapoval et al., 2001; Suh et al., 2003). Dagegen scheint B7-H4 ein negatives Signal zu vermitteln, das TZR-medierte Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und IL-2 Produktion inhibiert (Prasad et al., 2003; Sica et al., 2003; Zang et al., 2003). Ähnlich wie für B7-H1 wird deshalb für B7-H4 eine

Rolle in der Regulation von T-Zelltoleranz und Limitation von Immunantworten in peripheren Geweben postuliert.

Als neuestes Mitglied der CD28-Familie wurde BTLA identifiziert (Watanabe et al., 2003). Funktionell ähnlich zu PD-1 und CTLA-4 wird es nur auf aktivierten, jedoch nicht auf ruhenden T-Zellen sowie auf B-Zellen exprimiert. Studien mit Zellen aus BTLA^{-/-} Mäusen postulieren einen inhibitorischen Effekt des Moleküls auf T- und B-Zellen, ebenso deutet der Phänotyp der Knockoutmaus mit einer erhöhten Suszeptibilität für Autoimmunerkrankungen auf eine inhibitorische Funktion hin (Watanabe et al., 2003). Ob B7-H4 der Ligand von BTLA ist, bleibt umstritten.

Es bedarf weiterer Studien, um die tatsächliche *in vivo* Relevanz der jüngsten Mitglieder der B7-CD28-Superfamilie aufzudecken, ihre Rezeptoren zu identifizieren und ihre Funktionen im Zusammenspiel mit anderen kostimulatorischen Molekülen für die T-Zell-Aktivierung bzw. Toleranz zu verstehen.

1.4 Autoimmunität

Autoimmunerkrankungen können sich in einem Organismus besonders dann manifestieren, wenn zentrale und periphere Toleranzmechanismen gestört und autoreaktive Lymphozyten unkontrolliert sind (Sprent and Kishimoto, 2001). Bei der Selektion im Thymus können unterschiedliche Ereignisse zum Verlust der zentralen Toleranz führen (Greenwald et al., 2005):

- 1) Das jeweilige Antigen wird nicht im Thymus, sondern nur Gewebe-spezifisch exprimiert,
- 2) das Antigen wird im Thymus ineffektiv oder nur in geringen Mengen exprimiert,
- 3) der T-Zell-Rezeptor hat nur geringe Avidität zum Antigen oder
- 4) das Antigen-präsentierende MHC-Molekül ist instabil oder in zu geringer Dichte auf APZ des Thymus exprimiert.

Darüber hinaus können Defekte der peripheren Toleranzmechanismen (z.B. durch Mutationen der Gene für CTLA-4 oder FoxP3) und genetische Prädisposition (z. B. Expression bestimmter MHC-Moleküle) zu Autoimmunerkrankungen führen.

Zu den Umweltfaktoren zählen Infektionen, Stress und der Einfluss von Hormonen. Infektionen können die Aktivierung von Immunzellen in der Peripherie initiieren, indem pathogene Epitope den körpereigenen Strukturen ähneln und autoreaktive Zellen aktiviert werden (molekulare Mimikry). So konnte in SJL Mäusen ein Epitop aus einem von *Haemophilus influenzae* exprimierten Protein identifiziert werden, das eine PLP₁₃₉₋₁₅₁ spezifische Immunantwort und demyelinisierende Erkrankung auslöst (Olson et al., 2005). Im Gegensatz dazu

werden beim sog. Epitop „spreading“ bisher unzugängliche körpereigene Antigene als Folge einer Infektion freigesetzt. Nach entsprechender Antigenprozessierung und -präsentation durch APZ können autoreaktive Zellen so aktiviert werden und gewebespezifische Entzündungen auslösen. Experimentell konnte das durch Infektion von SJL Mäusen mit dem *Theiler Virus* gezeigt werden, wobei eine ZNS-spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort resultierend in demyelinisierender EAE durch Epitop „spreading“ generiert wurde (Vanderlugt and Miller, 2002).

Im folgenden Abschnitt sollen die Multiple Sklerose, die häufigste chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS, und ihr Tiermodell, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) näher beleuchtet werden.

1.4.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist die verbreitetste neuroimmunologische Erkrankung sowie die am häufigsten vorkommende entzündliche ZNS-Erkrankung, von der weltweit ca. 2,5 Mio. Menschen betroffen sind (Reichardt et al., 2006). Neuropathologisch ist sie gekennzeichnet durch fokale, entzündlich-entmarkende Läsionen im ZNS (sog. Plaques), welche durch Zerstörung der Markscheiden von Nervenfasern entstehen. Bevorzugt treten Entmarkungs-herde in der weißen Substanz des ZNS auf, besonders Sehnerv, periventrikulärem Marklager, Kleinhirn, Hirnstamm und im Rückenmark. Im Verlauf der Erkrankung zeigen sich histopathologisch zusätzlich Infiltrationen mit Immunzellen, Demyelinisierung, Gliose sowie Axonverlust und -schädigung.

MS manifestiert sich meist zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr und betrifft Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer. Die Beschwerden, unter denen MS-Patienten leiden, richten sich nach Intensität und Lokalisation der auftretenden Myelinschädigung bzw. des axonalen Schadens im ZNS. Klinische Symptome äußern sich meist in Form eines Schubes und umfassen Sehstörungen, Sensibilitätsstörungen, Lähmungserscheinungen, Schwindel und Spastiken. Die Krankheitsverläufe insgesamt sind sehr variabel und reichen von fast symptomlosen Verlauf bis hin zum Tod innerhalb weniger Monate. Je nach Verlauf der Erkrankung unterscheidet man drei Formen:

Bei der schubförmig remittierenden MS (ca. 85-90% der Fälle) lassen sich einzelne Phasen der Erkrankung und Erholung (Schübe) unterscheiden, in welchen sich die Symptome teilweise bis komplett zurückbilden. Die sekundär progrediente MS zeichnet sich durch eine langsame Zunahme neurologischer Defizite ohne erkennbare Schübe und Rückbildung der

Symptome aus. Bei der primär progressiven Form, die in 10-15 % aller Fälle auftritt, findet eine kontinuierliche Verschlechterung des Zustandes ohne erkennbare Schübe statt.

Die Ätiologie von MS ist immer noch unbekannt. Verlauf und Inzidenz werden jedoch durch genetische Gegebenheiten und Umweltfaktoren mitbestimmt (Ebers et al., 1995). Anhand der weltweiten Verteilung von MS spiegelt sich die Bedeutung der Umweltfaktoren wider: während MS hauptsächlich in Industriestaaten der nördlichen Hemisphäre auftritt, nimmt die Inzidenz zum Äquator hin ab (Kurtzke and Bui Quoc, 1980).

Es wird allgemein angenommen, dass MS in erster Linie eine durch die Effekte autoreaktiver $CD4^+$ T-Zellen vermittelte Erkrankung ist. Ausgehend von der Präsentation ZNS-spezifischer Autoantigene durch APZ (wie z.B. DZ) werden naive $CD4^+$ T-Zellen aktiviert. Erkenntnisse aus Tierversuchen zeigen, dass dabei vor allem die Myelinantigene Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), Proteolipidprotein (PLP) und Myelinbasisches-Protein (MBP) eine Rolle spielen. Aktivierte $CD4^+$ T-Zellen migrieren zum ZNS, passieren die Bluthirnschranke und werden durch Kontakt mit ZNS-residenten oder infiltrierenden APZ reaktiviert. Sie setzen proinflammatorische Mediatoren und Zytokine ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$) frei, was wiederum zur erhöhten Expression von Oberflächenmolekülen auf APZ (MHC II), zu einer effizienteren Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen aus der Peripherie durch die Bluthirnschranke sowie weiterer Proliferation der T-Zellen im ZNS führt. Außerdem führt das zum Entzündungsprozess hin veränderte Milieu zur Aktivierung ZNS-residenter Makrophagen und Mikrogliazellen sowie zum erhöhten Einstrom von Komponenten des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen und Komplementfaktoren.

Der daraus resultierende Gewebeschaden setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen: direkter Zytokin-vermittelter Schaden von Myelin und Oligodendrozyten, direkter Angriff von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen auf Oligodendrozyten und Mikrogliazellen mit resultierender Apoptoseinduktion, Abbau von Oberflächenmyelinantigenen durch Makrophagen, sowie Komplement- und Antikörper-vermittelte Schädigungen. Als Folge der Demyelinisierung und axonalen Schädigung kommt es zur Beeinträchtigung der saltatorischen Erregungsleitung und damit zu den oben beschriebenen klinischen Symptomen.

In Abb. 1.3 ist ein hypothetisches Modell der Balance zwischen immunogenen und tolerogenen Mechanismen der bei der Initiation, Pathogenese und Remission von MS ablaufenden Immunprozesse dargestellt (Zozulya and Wiendl, 2008).

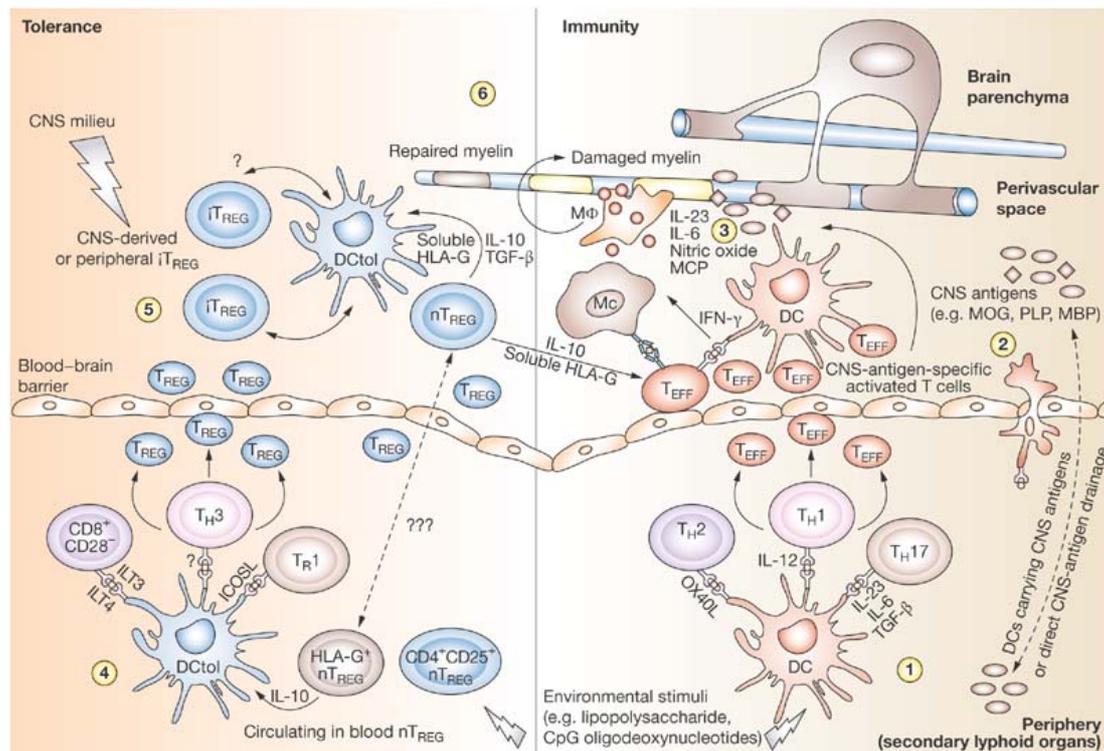


Abb. 1.3: Hypothese zur Balance der Immunantwort durch Aktivierung von T-Zellen. Durch immunogene DZ können autoreaktive T-Zellen (rechter Teil), durch tolerogene DZ regulatorische T-Zellen (linker Teil) aktiviert werden und den Verlauf der Immunantwort unterschiedlich modulieren: (1) Durch verschiedene Einflussfaktoren können immunogene DZ naive T-Zellen aktivieren und zu Effektorzellen differenzieren (Th1-, Th2-, Th17-Zellen). (2) Diese wandern über die periphere Zirkulation und die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS ein, wo sie durch lokale DZ restimuliert werden. (3) Aktivierte enzephalitogene T-Zellen (T_{EFF}) setzen im ZNS proinflammatorische Zytokine (z.B. IFN γ , IL-23, IL-6) frei, welche wiederum Mikrogliazellen (Mc) und Makrophagen ($M\Phi$) aktivieren. Dadurch wird eine Kaskade pathologischer Effekte in Gang gesetzt, die letztendlich zu Demyelinisierung und axonaler Schädigung im ZNS Parenchym führt. (4) Tolerogene DZ dagegen induzieren die Aktivierung verschiedener regulatorischer T-Zell-Populationen (T_{REG}), die ebenfalls ins ZNS einwandern können. (5) Hier können sie direkt (über die Sekretion von IL-10, TGF β , HLA-G) oder über Interaktion mit lokalen DZ enzephalitogene T-Zellen supprimieren. (6) Die Population von regulatorischen T-Zellen kann im ZNS nach Kontakt mit ZNS-Antigenen zudem expandieren und zur Limitation der lokalen Autoinflammation durch Reparatur der geschädigten Myelinschicht beitragen. Abbildung aus Zozulya and Wiendl, Nature Clinical Practice Neurology, 2008

Zusätzlich zur pathogenetisch wichtigen Rolle von $CD4^+$ T-Zellen scheinen auch $CD8^+$ T-Zellen einen relevanten Beitrag zur Initiierung und Perpetuierung von MS zu leisten. Es konnte gezeigt werden, dass in MS Läsionen mehr $CD8^+$ T-Zellen als $CD4^+$ T-Zellen auftreten und dass der Anteil von $CD8^+$ T-Zellen bei MS-Patienten im ZNS gegenüber der Peripherie erhöht ist (Friese and Fugger, 2005). Außerdem konnte in MS Läsionen eine Korrelation zwischen $CD8^+$ T-Zell Infiltration und axonalen Schädigungen gefunden werden (Bitsch et al., 2000). Möglicherweise tragen also $CD8^+$ T-Zellen einerseits durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine, andererseits durch ihre zytotoxische Funktion zur Schädigung von Myelin und Neuronen, insbesondere in der chronischen Phase oder bei Schüben der MS bei.

Auch die Rolle von B-Zellen bei der Pathogenese von MS ist noch ungeklärt. Schon Kabat et al. diagnostizierten 1948 erhöhte Immunglobulinwerte im Liquor von MS Patienten (Kabat et al., 1948). Später wurden B-Zellen und Plasmazellen sowie Myelin-spezifische Antikörper und Immunglobulintranskripte auch in MS Läsionen identifiziert (Hafler, 2004). Nach heutiger Überzeugung können B-Zellen auf folgende Weisen zur Pathologie von MS beitragen: B-Zellen können Makrophagen und T-Zellen aktivierende Zytokine wie IL-6, TNF α und IL-10 produzieren und so Schädigungen des ZNS verstärken (Fillatreau et al., 2002). Sie können aber auch als APZ mit T-Zellen interagieren, diese aktivieren und zur Zytokinsekretion anregen. Diese T-Zell-B-Zell-Interaktion wiederum führt sowohl bei B-Zellen also auch bei T-Zellen zur klonalen Expansion. Schließlich können sie als Antikörperproduzierende Plasmazellen Gewebeschaden durch Aktivierung von Komplement oder zellvermittelte Zytotoxizität verursachen (Dalakas, 2006).

CD8⁺ T-Zellen scheinen also ebenso wie B-Zellen an der Pathogenese von MS beteiligt zu sein, wobei das Ausmaß und die genauen Wirkmechanismen noch unklar sind.

1.4.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Tiermodelle eignen sich besonders um wesentliche Erkenntnisse zu Ursachen und Pathogenese einer Erkrankung zu gewinnen sowie Möglichkeiten einer Therapie zu testen. Die EAE stellt eine chronisch entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des ZNS dar und wird aufgrund ihrer ähnlichen klinischen, neuropathologischen und immunologischen Facetten als Tiermodell zur humanen MS angesehen. Größter Unterschied zum Spontanverlauf der MS ist jedoch, dass EAE aktiv durch Immunisierung mit ZNS-Antigen in Kombination mit Adjuvans oder passiv durch den Transfer enzephalitogener T-Zellen im Versuchstier induziert werden muss. Im Maussystem kann EAE durch aktive Immunisierung mit verschiedenen Myelinderivaten wie PLP, MBP und MOG in unterschiedlichen suszeptiblen Mausstämmen z.B. SJL, PLSJLF1, NOD und C57BL/6 induziert werden. Daraus resultieren je nach Stamm und verwendetem Neuropeptid unterschiedliche Verlaufsformen: MOG₃₅₋₅₅ Peptid induziert in C57BL/6 oder NOD Mäusen eine chronisch oder chronisch progressive EAE, während PLP₁₃₉₋₁₅₁ in SJL Mäusen eine schubförmig remittierende Erkrankung generiert und Immunisierung mit MBP₁₋₁₁ in PL/J Mäusen in einer akuten monophasischen EAE resultiert (Kerlero de Rosbo et al., 1995; McRae et al., 1992). So können auch im Mausmodell die unterschiedlichen klinischen Phänotypen der humanen MS abgebildet werden. Ausmaß und Stärke der Infiltration und Entzündungsreaktion im ZNS, Demyelinisierung sowie axonaler Schaden variieren ebenfalls je nach verwendetem Tiermodell. In den letzten Jahren wurden

verstärkt spontane EAE-Modelle erforscht, die im Gegensatz zu oben beschriebenen Versuchsansätzen keine artifiziellen, Adjuvans-basierten Induktionsprotokolle benötigen, sondern spontan zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen. Als Regulationsmechanismen können in diesem Zusammenhang Deletion von regulatorischen T-Zellen, ZNS-spezifische Expression von Chemokinen/Zytokinen oder für ZNS-Peptide spezifische, TZR-transgene Tiere den Verlauf einer EAE modulieren (Lafaille et al., 1994; Probert et al., 1995). Insbesondere doppelt transgene Mäuse, welche einen MHC II-restringierten, transgenen TZR für MOG₃₅₋₅₅ und gleichzeitig MOG-spezifische B-Zellen besitzen, entwickelten während der ersten 2-3 Lebensmonate zu 50% spontan eine inflammatorische Erkrankung mit Demyelinisierung im Rückenmark und in den Sehnerven (sog. Devic-Typ) (Bettelli et al., 2006a).

Der typische klinische Verlauf einer EAE äußert sich als ansteigende Paralyse der Extremitäten, beginnend mit einer Schwanzlähmung gefolgt von Lähmungen der Hinterläufe bzw. zusätzlich der vorderen Extremitäten. Für die Initiation der Erkrankung müssen wie bei der MS autoreaktive T-Zellen in der Peripherie aktiviert werden und über die Bluthirnschranke migrieren, um ins Zielorgan ZNS zu gelangen. Dort erfolgt eine Reaktivierung der enzephalitogenen T-Zellen mit lokalen APZ, wodurch Entzündungsprozesse und Gewebeschädigung in Gang gesetzt werden.

Die bei der Entwicklung von EAE auftretenden Ereignisse können im wesentlichen in drei Phasen gegliedert werden: Während der Induktionsphase findet das initiale T-Zell-Priming, also die Aktivierung, Expansion und Differenzierung von autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie statt. In der anschließenden Effektorphase gelangen diese Myelin-spezifischen aktivierten T-Zellen ins ZNS, wo sie durch lokale APZ reaktiviert werden, tiefer ins Hirnparenchym migrieren und Gewebeschaden verursachen. In einer dritten Phase werden je nach Tiermodell während des sog. EpiTop „spreadings“ T-Zellen mit neuen EpiTop-Spezifitäten aus der Peripherie rekrutiert oder es kommt zur Remission der klinischen Symptome.

1.4.2.1 Induktionsphase

Für die aktive Immunisierung und Induktion einer EAE werden die Versuchstiere mit Myelinantigenen in Gegenwart von einem starken Adjuvans wie *Mycobacterium tuberculosis* enthaltendes Freund's Adjuvans immunisiert. Alternativ werden primäre myelin-spezifische T-Zellen oder T-Zell-Linien intravenös (i.v.) appliziert (Ben-Nun and Cohen, 1982; Zamvil and Steinman, 1990). Zusätzlich zur Immunisierung/T-Zell-Injektion erfolgt die intraperitoneale (i.p.) Gabe von Pertussistoxin, dessen Effekte noch nicht eindeutig geklärt sind. Es wird jedoch diskutiert, dass Pertussistoxin kurzfristig die Frequenz regulatorischer T-Zellen redu-

ziert bzw. die Öffnung der Bluthirnschranke begünstigt (Hofstetter et al., 2002). Durch die Immunisierung werden myelinspezifische T-Zellen aktiviert und sie expandieren in den peripheren lymphatischen Organen.

In der Induktionsphase der EAE wird das periphere T-Zell Repertoire der CD4⁺ T-Zellen zu aktivierten, autoreaktiven, Myelin-spezifischen Th1- und Th17-Zellen hin verschoben. Während zunächst von aktivierten DZ-sezerniertes IL-12 und proinflammatorisches IFN γ sowie TNF α als primär pathogenetisch relevante Zytokine vermutet wurden, zeigten spätere Ergebnisse, dass der IL-23/IL-17 Signaltransduktionsweg eine weitaus bedeutendere Rolle für die Pathogenese der EAE spielt (Banchereau et al., 2003; Krakowski and Owens, 1996; McKenzie et al., 2006; Zhang et al., 2003). Myelin-spezifische Th1-Zellen können EAE induzieren, IFN γ und TNF α wurden in ZNS Läsionen während der EAE identifiziert (Cua et al., 2003; Kennedy et al., 1992; Kuchroo et al., 1993; Miller and Karpus, 1994). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass IL-12^{-/-} Mäuse auch EAE-suszeptibel waren und sich die klinischen Symptome bei IFN γ ^{-/-} oder anti-IFN γ Ak behandelten Mäusen sogar verschlimmerten (Chu et al., 2000; Cua et al., 2003; Gran et al., 2002; Willenborg et al., 1996). IL-23, das von aktivierten DZ und Makrophagen produziert wird, beeinflusst wesentlich die Differenzierung und Expansion von Th17-Zellen, die wiederum Autoimmunantworten und EAE verstärken können (McKenzie et al., 2006). Adoptiver Transfer von Th17-Zellen resultierte im Gegensatz zu transferierten Th1-Zellen in einer EAE in SJL Mäusen, IL-17 bzw. IL-23 neutralisierende Antikörper milderten den Verlauf der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE in C57BL/6 Mäusen und IL-17^{-/-} Mäuse zeigten sich resistent gegen die Induktion von EAE (Hofstetter et al., 2005; Komiyama et al., 2006; Langrish et al., 2005). Es ist allgemein akzeptiert, dass Th2-Zellen und Th2-spezifische Zytokine eine modulierende Rolle bei der EAE spielen. Myelin-spezifische Th2-Zellen bewirken Protektion oder Aufhebung klinischer EAE-Symptome, IL-4 und IL-10 sind nicht in der akuten Phase der EAE, sondern während der Remission in ZNS Läsionen detektierbar (Kennedy et al., 1992; Khoury et al., 1992; Kuchroo et al., 1995). In IL-10^{-/-} Mäusen verschlimmerte sich die EAE, während Deletion von IL-4 keinen unterschiedlichen Phänotyp zu Wildtyp (wt)-Kontrollen zeigte (Bettelli et al., 1998).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Th1/Th2-Paradigma in der von Mosman et al. postulierten Form nicht auf die EAE-Situation übertragen werden kann, sondern dass zusätzlich eine IL-23 gesteuerte Th17-Zellpopulation für die Entwicklung von EAE eine wichtige Rolle spielt. Der differenzielle Beitrag von Th1-, Th17- und möglicherweise

weiteren Th-Zell-Subpopulationen auf Initiation, Perpetuierung und Nachhaltigkeit der induzierten Immunantwort muss jedoch noch geklärt werden.

1.4.2.2 Effektorphase

Nach der Primingphase mit Aktivierung, Expansion und Differenzierung myelinreaktiver T-Zellen in der Peripherie verlassen die enzephalitogenen T-Zellen die sekundären lymphatischen Organe und zirkulieren im Körper auf der Suche nach Zielzellen, die ihr spezifisches Antigen tragen. Die Effektorphase beinhaltet sowohl die Rekrutierung von Myelin-spezifischen T-Zellen aus dem systemischen Immunkompartiment zu Oligodendrozyten, ihren Zielzellen im ZNS, als auch ihre Reaktivierung im ZNS durch lokale APZ. Um über die Bluthirnschranke ins Neuropil migrieren zu können, reduzieren Myelin-spezifische Effektor T-Zellen die Expression von Aktivierungsmarkern wie CD25 oder OX-40 und erhöhen den Anteil membranständiger Chemokinrezeptoren (Flügel et al., 2001). Chemokine sind kleine, Chemotaxis-vermittelnde basische Proteine, die in Zusammenhang mit Zellmigration in lymphatischen Organen bzw. Rekrutierung von Zellen zu Entzündungsherden charakterisiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass Induktion von EAE in der Expression von verschiedenen Chemokinrezeptoren wie CCR1-5, CCR8, CXCR2 und CXCR3 auf ZNS-isolierten T-Zellen resultierte (Fife et al., 2001; Matejuk et al., 2000). Wichtige Rollen für die Immunpathogenese von EAE wurden besonders RANTES und MCP-1 als inflammatorische Chemokine zugeschrieben (Izikson et al., 2000; Karpus et al., 1995). CCR5 und CXCR3 wurden als Th1-assoziierte Chemokinrezeptoren proinflammatorische Eigenschaften, CCR3 und CCR4 als Th2-assoziierten Markern negativ modulierende Wirkung attribuiert (Fischer et al., 2000). Zusätzlich werden für die Migration über die Endothelzellbarriere der Bluthirnschranke Adhäsionsmoleküle und deren Liganden wie VLA-4/VCAM-1 oder LFA-1/ICAM-1 benötigt (Engelhardt et al., 1998). Die Transmigration medieren darüber hinaus Metalloproteinasen (Kieseier et al., 1998). Diese Interaktionen zwischen enzephalitogenen T-Zellen mit Endothelzellen sind die maßgeblichen Faktoren für die Einwanderung aktivierter Immunzellen ins Zielgewebe.

Während unspezifische T-Zellen zwar im ZNS zirkulieren, es aber rasch wieder verlassen, werden im Gegensatz dazu ZNS-Antigen-spezifische T-Zellen zurückgehalten (Hickey et al., 1991). Die Retention von T-Zellen im ZNS und die nachfolgende EAE-Pathologie erfordert demnach die APZ-vermittelte Erkennung Antigen-spezifischer T-Zellen im ZNS. Zudem können die eigentlichen Zielzellen, Oligodendrozyten, aufgrund ihrer mangelnden MHC II-Expression nicht von myelinspezifischen T-Zellen erkannt werden (Lee and Raine, 1989). Es ist noch unklar, welche Zelltypen genau die Reaktivierung von T-Zellen im ZNS medieren

und so die Neuroinflammation initiieren. Die bestrahlungsresistenten, CD11b⁺ CD45^{hoch} perivaskulären Makrophagen scheinen ebenso wie die bestrahlungssensitiven CD11c⁺ DZ eine wichtige Rolle für die ZNS-Antigenpräsentation zu spielen (Greter et al., 2005; Heppner et al., 2005). Außerdem können Mikrogliazellen, Astrozyten und Endothelzellen Antigene präsentieren (Shrikant and Benveniste, 1996). Es wird postuliert, dass in einem Mehrstufenprozess zunächst im perivaskulären Raum von CD11c-exprimierenden APZ (DZ) Myelinantigene auf MHC II-Molekülen CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden. Diese so reaktivierten T-Zellen wandern ins ZNS Parenchym ein, treffen auf Oligodendrozyten und setzen proinflammatorische Zytokine frei. In der Folge wird durch Aktivierung und Entzündung der Endothelzellen die Bluthirnschranke zunehmend permeabler für periphere Lymphozyten und Monozyten, die angezogen von Chemokinen wie RANTES und MIP-1a in den perivaskulären Raum rekrutiert werden. Astrozyten vermitteln durch Sekretion von IP-10 deren Migration ins ZNS Parenchym. Die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen stimuliert parenchymale CD11b⁺ Zellen (Mikrogliazellen), die ihrerseits Zytokine wie IL-12, IL-23, TNF α , Chemokine wie MCP-1 und toxische Mediatoren wie Stickoxide und reaktive Sauerstoffspezies freisetzen und so unspezifische Entzündungsreaktionen aufrechterhalten (Platten and Steinman, 2005). Aktivierte Makrophagen sind letztlich Hauptverursacher des auftretenden Gewebeschadens, wobei Myelin von den Axonen phagozytiert wird und so Epitop „spreading“ initiiert werden kann

1.4.2.3 Epitop „spreading“ / Remission

Durch den von phagozytierenden Makrophagen verursachten Myelinabbau werden ZNS-Gewebestrukturen freigelegt, die wiederum von residenten und peripheren APZ prozessiert werden können. Werden so neu entstandene Myelinantigene an APZ MHC II-Molekülen präsentiert, kann eine zweite Welle enzephalitogener T-Zellen aktiviert und ins ZNS rekrutiert werden (Vanderlugt and Miller, 2002). Dieses Phänomen bezeichnet man als Epitop „spreading“, bei dem verschiedene Epitope, die deutlich different und nicht kreuzreaktiv mit dem dominanten, die Immunreaktion auslösenden Epitop sind, zur hauptsächlichen Zielstruktur der ablaufenden Immunantwort werden. Dabei ist die Epitopspezifität der initialen, ersten Welle autoreaktiver T-Zellen irrelevant. Während des schubförmig-remittierenden Verlaufs der PLP₁₃₉₋₁₅₁ induzierten EAE in SJL Mäusen konnten CD4⁺ T-Zellen mit Spezifität für PLP endogene Epitope (intramolekulares Epitop „spreading“) gefunden werden (Vanderlugt et al., 1998). Auch intermolekulares Epitop „spreading“, bei dem T-Zellen mit Epitopspezifitäten aus anderen Myelinproteinen auftreten, konnten in diesem Modell nachgewiesen werden (Yu et al., 1996). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung naiver PLP₁₃₉₋₁₅₁-

spezifischer T-Zellen in mit PLP₁₇₈₋₁₉₁ immunisierten SJL Mäusen exklusiv im ZNS und nicht in den zervikalen Lymphknoten oder anderen peripheren lymphoiden Organen stattfindet und größtenteils von DZ vermittelt wird (McMahon et al., 2005). Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen Epitop „spreading“ und dem Ausmaß an Demyelinisierung während der akuten EAE-Phase gefunden werden. Dieses Phänomen scheint besonders für das Auftreten von Krankheitsschüben im chronischen Verlauf eine Rolle zu spielen, indem die Immunantwort ausgeweitet und verlängert wird (Miller and Eagar, 2001).

Im Gegensatz dazu konnte jedoch in anderen Mausmodellen keine vergleichbare Relevanz von Epitop „spreading“ im Verlauf der EAE aufgezeigt werden (Fazilleau et al., 2007; Jones et al., 2003; Smith et al., 2005). Dies impliziert, dass Epitop „spreading“ unterschiedliche Relevanz in verschiedenen EAE-Modellen hat, wobei es eher bei schubförmigen als bei chronischen Erkrankungsformen auftritt. Bei letzteren kann es je nach Tiermodell auch eine Remissionsphase geben, in der die Frequenz von aktivierten, im ZNS befindlichen autoreaktiven T-Zellen und Makrophagen hauptsächlich durch Apoptose sinkt (Bauer et al., 1995; Pender et al., 1992). Daraus resultieren eine Reduktion der klinischen Symptome sowie die Prävention von Rückfällen.

1.5 Ziel der Studie

Ziel dieser Studie war es, die Rolle von B7-H1 auf Aktivierung und Funktionalität von Neuroantigen-spezifischen T-Zellen im Kontext der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE zu charakterisieren. Anhand dieses Modellsystems sollte durch *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Versuche untersucht werden, in wieweit B7-H1 Relevanz hinsichtlich tolerogener bzw. immunogener APZ für die Mechanismen zur (Re)aktivierung autoaggressiver T-Zellen bzw. deren Kontrolle durch regulatorische T-Zell-Populationen hat.

In einem ersten Abschnitt sollte mithilfe von B7-H1^{-/-} Mäusen die Bedeutung des B7-H1/PD-1-Signalwegs für die ZNS-Läsionspathogenese eingehender charakterisiert werden. Dies erfolgte einerseits in den peripheren Immunorganen, da hier die Immunantwort initiiert wird, andererseits im ZNS, dem Zielorgan der MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Effektorzellen. Nach der klinischen sowie immunhistochemischen Evaluierung des Krankheitsverlaufs einer aktiven MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE im Vergleich zu wt Tieren sollte die Bedeutung von B7-H1 für die ZNS-lokalisierte Akkumulation, Aktivierung, Zytokinsekretion sowie Apoptoseinduktion von Immunzellen untersucht werden. Weiterhin war die Differenzierung des selektiven Beitrags von B7-H1 auf ZNS-residenten versus hämatopoetischen Zellen zur Läsionspathogenese Bestandteil der Analysen.

Des Weiteren sollte untersucht werden, welche Rolle B7-H1 auf peripheren, semi-maturen APZ bei der Vermittlung von Toleranzmechanismen zur Inhibition der Aktivierung auto-aggressiver T-Zellen spielt. In diesem Kontext sollte die therapeutische Beeinflussbarkeit von tolerogenen APZ durch Modulation des B7-H1/PD-1-Signalwegs charakterisiert werden. Wesentliche Parameter hierzu waren der klinische Verlauf, Quantität und Qualität der Immunzellinfiltration im ZNS, Anteil der Polarisation der primären, peripheren Immunantwort zu Th1/Th2/Th17-Antworten und/oder Beteiligung von Komponenten des angeborenen Immunsystems.

Nachdem die große Bedeutung von APZ im ZNS für die (Re)Aktivierung enzephalitogener T-Zellen gezeigt werden konnte, sollte in einem letzten Abschnitt insbesondere der Beitrag von B7-H1 auf intrazerebralen (i.z.) immunogenen bzw. tolerogenen DZ untersucht werden. Auch hier sollte die unterschiedlich starke Ausbildung von klinischen Symptomen, die Immunzellinfiltration im ZNS und die Funktionalität MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen in der Peripherie und im Zielorgan ausgewertet werden. Zusätzlich sollte die Rolle von B7-H1 auf i.z. DZ für die ZNS-gerichtete Rekrutierung und Funktionalität von Treg geklärt werden.

Die aus den unterschiedlichen Versuchsansätzen gewonnenen Erkenntnisse sollten zu einem besseren Verständnis des B7-H1/PD-1-Signalwegs für die Initiierungs-, Exazerbations- und Chronifizierungsmechanismen der EAE beitragen. Zudem sollten Ansatzpunkte für potenziell neue Therapieoptionen gefunden werden, in denen durch Modulation von B7-H1 periphere Toleranzmechanismen aufrechterhalten bzw. inflammatorische Prozesse im Zielgewebe der autoimmunen Schädigung reguliert werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav Vakulab HP	Münchener Medizin Mechanik GmbH, Planegg
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop	Zeiss, Jena
ELISA Image Reader Multiskan	EX Labsystems, Helsinki, Finnland
Fotomikroskop Axioplan 2	Zeiss, Jena
Gasbrenner	WLD-Tec, Göttingen
Gefrierschrank	Liebherr, Biberach an der Riss
Inkubator	Heraeus, Hanau
Kryostat	Leica, Wetzlar
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riss
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
O ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau
pH-Messgerät	WTW, Weilheim
Pipetten	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Röntgenbestrahlungsgerät RT 200	C.H.F. Müller, Hamburg
Schüttler	E. Bühler, Hechingen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Hettich-Zentrifugen, Adelsried
Vortex Mixer	A. Hartenstein, Würzburg
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze
Zentrifuge	Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml/ 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
15 ml/ 50 ml Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Diabetesspritzen	BD Biosciences, Heidelberg

Einwegspritzen	B. Braun, Melsungen
Handschuhe	Cardinal Health, Baesweiler
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg
Kombispitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Kryogefäße	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten (ELISA)	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten (ELISPOT)	Millipore, Schwalbach
Objektträger	Langenbrinck, Teningen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikpipetten	Corning, New York, USA
Skalpell	B. Braun, Melsungen
Sterilfilter	Nalgene, Hereford, UK
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden
Zellsieb	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien

2- Propanol	J.T. Baker, Griesheim
2-Mercaptoethanol	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua ad injectabilia	B. Braun, Melsungen
Carboxyfluoreszin-Diazetat-Succimidyl-Ester (CFSE)	Molecular Probes, Eugene, USA
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Diaminobenzidin (DAB)	KemEnTec, Kopenhagen, Dänemark
Dimethylsulfoxid (DMSO)	C. Roth, Karlsruhe
Einbettmedium Aquatex	Merck, Darmstadt
Einbettmedium Tissue Tek OCT Compound	Sakura Finetek, Torrance, USA
Einbettmedium Vitro-Clud	R. Langenbrinck, Emmendingen
Ethanol	J.T. Baker, Griesheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Merck, Darmstadt

Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumaluminiumsulfat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ketaminhydrochlorid	Pfizer, Karlsruhe
Methanol	J.T. Baker, Griesheim
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumjodat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Percoll	GE Healthcare, München
Triton-X	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylazinhydrochlorid (Rompun)	Bayer Vital, Leverkusen
Zitronensäure	Serva, Heidelberg

2.1.4 Puffer und Lösungen

ACK-Puffer	150 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA pH auf 7,3 einstellen
Anästhetikumlösung	2 ml Ketamin 2,5% 250 µl Rompun 2% 4 ml NaCl 0,9 %
EDTA-Blockierungslösung	20 mM EDTA 200 µg/ml IgG aus Ratte in FACS-Puffer
ELISA-Waschpuffer	0,05% Tween-20 in PBS

FACS-Puffer	0,1% BSA 0,1% Natriumazid in PBS
Hämalaunlösung nach Mayer	1 g Hämatoxylin 0,2 g Natriumjodat 50 g Kaliumaluminiumsulfat 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure vor Gebrauch filtrieren
MACS-Puffer	0,5% BSA 2 mM EDTA in PBS
PBS	0,14 M NaCl 2,7 mM KCl 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH auf 7,4 einstellen
Peroxidaseblock	200 ml Methanol 3,5 ml H ₂ O ₂

2.1.5 Biochemikalien, Medien und Supplemente

BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
ConA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cotrimoxazol	Ratiopharm, Ulm
DMEM	PAA Laboratories, Pasching
FCS	PAA Laboratories, Pasching
Geneticin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
Gentamicin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
HEPES	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
Inkomplettes Freud'sches Adjuvans	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
LPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
mGM-CSF	PeptoTech, Hamburg
mIFN γ	PeptoTech, Hamburg

mTNF α	PeptoTech, Hamburg
Mycobacterium tuberculosis H37Ra	Difco, Detroit, USA
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Lonza, Basel, Schweiz
PBS	PAA Laboratories, Pasching
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
Pertussistoxin	Alexis Biochemicals, San Diego, USA
RPMI 1640	PAA Laboratories, Pasching
Trypsin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe

2.1.6 Kits

Avidin-Biotin-Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
BD Cytotfix/Cytoperm Plus	BD Biosciences, Heidelberg
Fixation/Permeabilization Kit	
BrdU Flow Kit APC	BD Biosciences, Heidelberg
CD4 ⁺ T cell Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
ELISA Kits	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
IFN γ ELISPOT Kit	BD Biosciences, Heidelberg
IL-17 ELISPOT Kit	eBioscience, San Diego, USA
In situ Cell Death-Detection Kit, TMR red	Roche, Penzberg
Mouse Regulatory T cell Staining Kit	eBioscience, San Diego, USA
StreptABComplex-Kit	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

2.1.7 Versuchstiere

Wildtyp C57BL/6 Mäuse wurden von der Firma Harlan Winkelmann erworben. B7-H1^{-/-} Mäuse wurden von L. Chen (Baltimore, USA) generiert und ein Zuchtpaar davon wurde von P. Knolle (Bonn) für die hausinterne Nachzucht zur Verfügung gestellt. 2D2 Mäuse wurden von V. Kuchroo (Boston, USA), CD1d^{-/-} Mäuse von L. van Kaer (Nashville, USA) und J α 281^{-/-} Mäuse von M. Taniguchi (Kanagawa, Japan) zur Verfügung gestellt.

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Spezifität	Klon	Format	Quelle
B7-H1	Ratte anti-Maus	MIH5	PE	eBioscience
CD11b	Ratte anti-Maus	M1/70	FITC, PE, PerCP	BD Pharmingen

CD11c	Hamster anti-Maus	HL3	FITC, APC	BD Pharmingen
CD205	Ratte anti-Maus	NLDC-145	Alexa Fluor 647	Serotec
CD25	Ratte anti-Maus	PC61.6	PE	eBioscience
CD4	Ratte anti-Maus	RM4-5	FITC, PerCP, APC	BD Pharmingen
CD40	Hamster anti-Maus	HM40-3	FITC	BD Pharmingen
CD44	Ratte anti-Maus	IM7	FITC	BD Pharmingen
CD62L	Ratte anti-Maus	MEL-14	APC	BD Pharmingen
CD69	Hamster anti-mouse	H1.2F3	FITC	BD Pharmingen
CD8	Ratte anti-Maus	53-6.7	FITC, PE, APC	BD Pharmingen
CD80	Hamster anti-mouse	16-10A1	Biotin	BD Pharmingen
CD86	Ratte anti-Maus	GL1	Biotin	BD Pharmingen
H-2K ^b	Maus anti-Maus	AF6-88.5	PE	BD Pharmingen
I-A/I-E	Ratte anti-Maus	114.15.2	PE	BD Pharmingen
IFN γ	Ratte anti-Maus	XMG1.2	APC	BD Pharmingen
IL-17	Ratte anti-Maus	TC11-18H10	PE	BD Pharmingen
PD-1	Ratte anti-Maus	RMP1-30	PE	eBioscience
PIR-A/B	Ratte anti-Maus	6C1	PE	BD Pharmingen

2.1.8.2 Antikörper für die Histologie

Antigen	Antikörper	Klon	Quelle
CD11b	Ratte anti-Maus	OX-42	Serotec
CD4	Ratte anti-Maus	YTS191.1	Serotec
CD8	Ratte anti-Maus	OX-8	Chemicon

2.1.8.3 Antikörper für die Zellkultur

Antigen	Antikörper	Klon	Quelle
B7-H1	Ratte anti-Maus	10B5	Zur Verfügung gestellt von L. Chen, Baltimore, USA
CD28	Hamster anti-Maus	37.51	BD Pharmingen
CD3 ϵ	Ratte anti-Maus	145-2C11	BD Pharmingen

2.1.9 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

DZ-Medium	RPMI 1640 10% FCS 1% Pen/Strep 1% L-Glutamin 50µM Mercaptoethanol
Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO
Standardmedium (SC)	DMEM oder RPMI 1640 10% FCS 1% Pen/Strep 1% L-Glutamin
T-Zellmedium	DMEM 5% FCS 1% L-Glutamin 10mM HEPES 25µg/ml Gentamicin 50µM Mercaptoethanol 1% NEAA
Waschmedium	DMEM 1% FCS 1% Pen/Strep 1% L-Glutamin

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Methoden, die eine nachfolgende Kultur der Zellen erforderten, erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Kultivierung erfolgte dabei in einem Inkubator bei 37°C Temperatur und 5 % CO₂. Organe bzw. primäre Zellen wurden, soweit nicht anders beschrieben, aus durch CO₂-Begasung getöteten Mäusen gewonnen. Alle Zentrifugationsschritte der jeweiligen Zellsuspensionen wurden, sofern nicht anders angeführt, bei 1500 rpm/ 5 min bei 4°C durchgeführt.

2.2.1.1 Bestimmung der Zellzahl lebender Zellen

Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension wurde mit Hilfe einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung im Hämatozytometer (Neubauer-Zählkammer) durchgeführt. Der Farbstoff Trypanblau dringt bei toten Zellen durch die poröse Zellmembran und interkaliert mit der DNS. Unter dem Mikroskop wurden die vitalen, also nicht gefärbten Zellen in dem definierten Volumen von 10µl der angemessen verdünnten Zellsuspension in vier Großquadraten bei 40facher Vergrößerung ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl wurde anhand folgender Formel kalkuliert:

$$\text{Anzahl der gezählten Zellen}/4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur dauerhaften Konservierung von primären Zellen und Zelllinien wurden diese abzentrifugiert, in einer geeigneten Dichte (1×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml) in Einfriermedium aufgenommen, in Kryogefäße überführt und rasch in gekühlte Einfrierboxen (Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene) gegeben. Diese wurden zunächst für 1-3 Tage bei -80°C weiter abgekühlt, bis die Zellen schließlich in Flüssigstickstoff (-196°C) dauerhaft gelagert wurden.

Zum Auftauen von Zellen wurden die Kryogefäße bei 37°C kurz inkubiert und die Zellsuspension wurde in 10-20 ml frisches Medium pipettiert, um das für die Zellen toxische DMSO im Einfriermedium zu verdünnen. Die Zellen wurden zweimal mit Medium gewaschen, gezählt und anschließend für die jeweiligen Experimente verwendet.

2.2.1.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen und Kultivierung von Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen

Zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus der Milz wurde das Organ zunächst aus dem Tier isoliert, in Waschmedium überführt und mit dem Stempel einer 5 ml Spritze über einem 70µm Zellsieb verrieben. Die so entstandene Zellsuspension wurde abzentrifugiert, die darin enthaltenen Erythrozyten wurden mittels 5minütiger Inkubation bei RT in ACK Puffer lysiert und die Suspension wurde erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem SC Medium resuspendiert und nochmals über ein 70 µm Zellsieb gegeben, anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

Zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus den zervikalen Lymphknoten wurden die Organe aus dem Tier isoliert, in PBS aufgenommen und mit zwei Objektträgern zerrieben. Die daraus resultierende Zellsuspension wurde mit einem 40 µm Zellsieb filtiert, zentrifugiert, das Pellet in 5 ml frischem SC Medium resuspendiert und die Zellen wurden gezählt.

2.2.1.4 Isolierung und Kultivierung von mononukleären Leukozyten aus dem ZNS

Für die Isolierung von Lymphozyten aus dem murinen ZNS wurde eine Maus zunächst mittels CO₂ getötet, der Brustkorb eröffnet und zur Entfernung von Blut aus dem gesamten Blutkreislauf mit 10 ml eiskaltem PBS über den linken Ventrikel des Herzens perfundiert. Das Rückenmark wurde mit Hilfe einer Spritze mit PBS aus dem Wirbelkanal herausgespült und zusammen mit dem freipräparierten Gehirn weiterverarbeitet. Pro Maus wurde das ZNS in einer mit 2 ml PBS gefüllten Petrischale erst mit einer Schere, danach mit einer 1 ml Spritze mechanisch zerkleinert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml 50% Percoll in PBS resuspendiert. Überschichtet wurde die Zellsuspension mit 2 ml 30% Percoll in PBS und der Dichtegradient bei 2500 rpm/ 4°C für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Lymphozyten in der Interphase zwischen beiden Lösungen wurden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und in SC Medium oder FACS Puffer aufgenommen.

2.2.1.5 Isolierung von Stammzellen aus murinem Knochenmark und Differenzierung zu DZ

Die Isolierung muriner Stammzellen aus dem Knochenmark diente der Gewinnung von DZ und wurde im wesentlichen nach der Methode von Lutz et al. durchgeführt (Lutz et al., 1999). Zunächst wurden beide Femura und Tibiae einer 6-10 Wochen alten Spendermaus entnommen und weitestgehend von umliegendem Gewebe und Muskelfasern befreit. Die Knochen wurden anschließend für 1 min in 70% Ethanol zur Desinfektion gelegt, einmal mit PBS gewaschen, oben und unten geöffnet und mit Hilfe einer 26 G Kanüle mit 5 ml PBS ausgespült. Die resultierende Zellsuspension wurde mehrmals auf- und abpipettiert um Zellagglutinate zu zerkleinern, zentrifugiert, das Pellet in 5 ml ACK-Puffer resuspendiert und für 2 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen zu 2×10^5 /ml in DZ-Medium aufgenommen und je 10 ml der Suspension in eine Petrischale für Bakterienkultur ausgesät.

Zur Differenzierung der Knochenmarkszellen zu DZ wurde dem Medium 10% GM-CSF haltiger Überstand der mit muriner GM-CSF cDNA transfizierten Myelomzelllinie Ag8653 zugefügt (Zal et al., 1994). Am 4. Tag der Kultur wurde erneut 10 ml GM-CSF haltiges Medium zugegeben, am 7. und 9. Tag wurden 10 ml Medium durch frisches GM-CSF haltiges Medium ersetzt. Die Ernte der ausdifferenzierten, leicht-adhärenenten bzw. in Suspension befindlichen DZ erfolgte in der Regel am 11. Tag der Kultur (optional auch 7. bzw. 9.

Tag). Dazu wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, der Boden der Petrischale leicht mit Medium gespült und beide Fraktionen wurden vereinigt. Die Zellzahl der darin befindlichen DZ wurde wie oben beschrieben bestimmt.

Für die Ausreifung der DZ-Populationen zu voll maturierten DZ wurden diese mit LPS (10 µg/ml), zur Generierung von semi-maturen DZ mit TNFα (500 U/ml) für 4 bis 24 h bei 37°C inkubiert. Gegebenenfalls wurden die Zellen zeitgleich mit 40 µg/ml MOG₃₅₋₅₅ beladen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und je nach Experiment weiterverwendet. Die Qualität der Zellen wurde zusätzlich durchflusszytometrisch überprüft.

2.2.1.6 Aufreinigung von Zellpopulationen mittels magnetischer Zellsortierung

Die magnetische Zellsortierung (MACS) dient der Sortierung von bestimmten Zellpopulationen aus Zellgemischen, wobei Antikörper-gekoppelte magnetische Partikel an bestimmte Zellen binden und diese beim Durchlauf durch eine in einem starken Magnetfeld befindliche Säule zurückgehalten werden. Nach Aufhebung der magnetischen Wechselwirkungen können die in der Säule enthaltenen, markierten Zellen eluiert werden. Je nach Anwendung bedient man sich dabei der positiven Selektion, bei der die markierten Zellen (Säuleneluat) die Zielzellen sind oder der Depletion, bei der die unmarkierten Zellen (Durchfluss) weiterverwendet werden. Alle hier genannten Zellsortierungen wurden manuell mit Zubehör der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt.

Zur Gewinnung von CD4⁺ T-Zellen wurde zunächst eine Einzelzellsuspension aus Milz und gegebenenfalls Lymphknoten einer Spendermaus wie unter 2.2.1.3 beschrieben hergestellt. Diese wurde in MACS-Puffer aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und die zu isolierenden Zellen wurden daraus nach Anleitung des Herstellers gewonnen. Die Reinheit der erhaltenen Zellpopulation wurde durchflusszytometrisch bestimmt und lag durchschnittlich bei über 90%.

2.2.1.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Detektion von optischen Signalen von Zellen, wenn diese im sog. FACS-Gerät (Fluorescence-activated cell sorting) einen Lichtstrahl passieren. Das emittierte Licht lässt je nach Absorption und Streuung Rückschlüsse auf Größe (messbar im Vorwärtsstreulicht, FSC) und Granularität (messbar im Seitwärtsstreulicht, SSC) der Zellen zu. Ergänzend kann mittels Fluoreszenzmessung die Expression bestimmter Moleküle auf Zellen detektiert und quantifiziert werden. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen entweder direkt mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorophoren) angefärbt oder mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Diese Antikörper binden epitopspezifisch an

intra- oder extrazelluläre Moleküle und erlauben so den gleichzeitigen Nachweis mehrerer unterschiedlich gefärbter Marker in einem Ansatz.

Alle Messungen wurden mit dem Gerät FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt und die Daten mit den Programmen CellQuest Pro bzw. FlowJo ausgewertet.

2.2.1.7.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

1×10^5 bis 1×10^6 Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt, einmal mit FACS-Puffer gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation verworfen. Das Zellpellet wurde in ca. 50 μ l FACS-Puffer gelöst und die jeweiligen spezifischen Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in einem Volumen von 50 μ l in FACS-Puffer zugegeben. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 4°C für 30 min im Dunkeln. Danach wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 100–500 μ l FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Analyse am FACS-Gerät auf Eis aufbewahrt.

Wurden statt direkt gefärbten, biotinylierte Antikörper verwendet, wurden die Zellen in einem zweiten Schritt mit Fluorophor-gekoppeltem Streptavidin inkubiert. Dieses bindet während der 30minütigen Inkubationszeit bei 4°C im Dunkeln an Biotin und ermöglicht so die Detektion Biotin-gebundener Zellen im Durchflusszytometer.

2.2.1.7.2 Intrazelluläre Färbung

In Anschluss an die Färbung von Molekülen auf der Zelloberfläche wurde in manchen Ansätzen eine intrazelluläre Färbung durchgeführt.

Für den intrazellulären Nachweis des Transkriptionsfaktors FoxP3 wurden die Lösungen und Antikörper des „Mouse Regulatory T cell Staining Kit“ (eBioscience, San Diego) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden bei 4°C 30 min lang fixiert und permeabilisiert, der darauffolgende optionale Blockierungsschritt entfiel und die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte für 30 min bei 4°C. Danach wurde zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und die Zellen bis zur Analyse in FACS-Puffer auf Eis gelagert. Der Nachweis von intrazellulären Zytokinen ist unter 2.2.2.4 beschrieben.

2.2.1.7.3 Aufreinigung von Zellpopulationen mittels FACS

Für die Sortierung von CD8⁺ T-Zellen aus ZNS Lymphozyten und Milzzellsuspensionen wurden die gewünschten Zellen wie unter 2.2.1.7.1 beschrieben angefärbt, außer dass statt FACS-Puffer MACS-Puffer für alle Wasch- und Inkubationsschritte verwendet wurde. Vor dem Sortieren am FACS-Gerät wurden die Zellen zur Vermeidung von Zellaggregaten noch-

mals über ein 70 µm Zellsieb gegeben. Die Reinheit der sortierten Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft und lag durchschnittlich bei 95-98%.

2.2.2 *Ex vivo* Versuche

2.2.2.1 Restimulationsassay

Zur Restimulation von primären Immunzellen aus ZNS oder Milz wurden diese je nach Volumen des Ansatzes und Analysemethode nach folgendem Schema ausplattiert:

Organ	Zellzahl	Volumen	Kulturplatte	Analysemethode
Milz	3×10^6	1 ml	24-Loch	ELISA
Milz	1×10^6	500 µl	48-Loch	ELISA
Milz	1×10^6	200 µl	96-Loch	ICCS
Milz	1×10^6	200 µl	96-Loch	CBA
Milz	2×10^5	200 µl	96-Loch	ELISPOT
ZNS	$5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	200 µl	96-Loch	CBA
ZNS	$2 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	200 µl	96-Loch	ELISPOT

Als Substanzen für die Restimulation kamen MOG₃₅₋₅₅ Peptid (10 µg/ml), ConA (5 µg/ml), CD3/CD28-beads (1:1, 1:10 je nach Zellzahl) und Medium zur Anwendung. Für alle Versuche wurden die Zellen in SC Medium kultiviert.

2.2.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist eine Methode zur Detektion und Quantifizierung von in einer Lösung enthaltenen Substanzen wie Proteinen, Viren und niedermolekulare Verbindungen. Das hier angewandte Prinzip zur Bestimmung von Zytokinen in einem Zellüberstand entsprach dem sog. Sandwich-ELISA, bei dem zunächst ein immobilisierter Antikörper an das zu untersuchende Antigen bindet. In einem nachfolgenden Schritt heftet sich daran ein Zweitantikörper und bildet einen Komplex mit einem weiteren, Enzym-gekoppelten Antikörper. Durch Zugabe von geeignetem Substrat erfolgt die Umsetzung vom Chromogen zu einem Farbstoff, dessen Intensität im Photometer gemessen werden kann. Die Intensität des Farbstoffes ist dabei proportional zur Konzentration des in der Probe vorhandenen Zytokins und kann mit Hilfe einer Standardkurve genau quantifiziert werden.

Die zu untersuchenden Überstände aus verschiedenen Zellkulturansätzen wurden durch Abzentrifugation der Zellen nach 24 bis 48 h Inkubation gewonnen. Bis zur Analyse wurden sie in Aliquots bei -20°C gelagert. IFN γ , IL-17, IL-4, IL-10 ELISA wurden mit Kits der Firma R&D Systems nach ihrer Empfehlung durchgeführt. Nach Abstoppen der Reaktion mit 2 N H $_2$ SO $_4$ wurde die Farbintensität unverzüglich am ELISA-Reader bei 450 nm Wellenlänge gemessen.

2.2.2.3 Enzyme-linked Immunospot Technique-Assay

Die Anwendung des Enzyme-linked Immunospot Technique (ELISPOT)-Assay erlaubt die Detektion und Quantifizierung zytokinsezernierender Zellen mittels spezifischer Bindung der Sekretionsprodukte an immobilisierte Antikörper. Ähnlich dem Prinzip des ELISA werden von den Zellen produzierte Zytokine an zwei unterschiedlichen Stellen über spezifische Fang- und Detektionsantikörper gebunden, wobei letzterer an Biotin gekoppelt ist. Eine nachfolgende Inkubation mit Avidin-HRP und die Zugabe von Substrat bewirkt die Umsetzung des Substrats zu einem Farbstoff und ermöglicht so die Visualisierung zytokinsezernierender Zellen auf der Membran der Mikrotiterplatte.

Die zu untersuchenden Zellpopulationen wurden auf PVDF-Membran bestückten 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät, 18 bis 24 h inkubiert und der Assay anschließend nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung und Quantifizierung der positiven Signale erfolgte durch die Firma CTL Europe GmbH (Aalen, Deutschland).

2.2.2.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Für den Nachweis von intrazellulär akkumulierten Zytokinen während *ex vivo* Zellkulturen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICCS) wurde das „BD Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit“ von BD Biosciences nach den Angaben des Herstellers verwendet.

In einer 96-Loch-Flachboden-Platte wurden jeweils 1×10^6 Milzzellen oder 5×10^5 Lymphknotenzellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ MOG $_{35-55}$ oder 5 $\mu\text{g/ml}$ ConA stimuliert. Maximal 12 h vor Ernte der Zellkultur wurde BrefeldinA-haltiges GolgiPlug Reagens in einer 1:500 Verdünnung zu der Kultur gegeben und diese weiter bei 37°C inkubiert. BrefeldinA interferiert mit dem anterograden Proteintransport vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgi Apparat und verhindert so die Transportvesikelbildung, was eine Akkumulation von Proteinen in der Zelle zur Folge hat. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Zellen in der Platte mit FACS-Puffer gewaschen, je Loch 20 μl der EDTA-Blockierungslösung zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde einmal mit FACS-Puffer gewaschen und die Oberflächen-

moleküle in der Platte gefärbt. Nach nochmaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden je Loch 150 µl Cytofix/Cytoperm Lösung zu den Zellen gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Permeabilisierungspuffer wurden die Antikörper für die zu detektierenden Zytokine zugegeben, ebenfalls 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und dann zum zweimaligen Waschen mit Permeabilisierungspuffer in FACS-Röhrchen überführt. Zum Schluss wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und am FACS-Gerät analysiert.

2.2.2.5 Zytokinbeadarray

Zur gleichzeitigen Analyse von zehn verschiedenen Zytokinen in niedrigvolumigen Zellkulturüberständen wurde ein Zytokinbeadarray (CBA) mit dem „Flow Cytomix Mouse Th1/Th2 10plex Kit“ der Firma Bender MedSystems verwendet. Bei dieser Analysemethode binden die im Zellkulturüberstand enthaltenen Zytokine spezifisch an Antikörper-gekoppelte beads, die sich wiederum in ihrer Größe und Fluoreszenzintensität unterscheiden. Um die Menge der an die Antikörper gebundenen Analyte zu bestimmen, werden zusätzlich ein biotinylierter Zweitantikörper und PE-markiertes Streptavidin zu dem Komplex zugefügt, was zu einer Freisetzung von Fluoreszenzsignalen führt. Im Durchflusszytometer kann anschließend die Position jeder einzelnen Beadsubpopulation genau bestimmt und dem jeweiligen Zytokin zugeordnet werden. Die Quantifizierung der in der Probe enthaltenen Analyte erfolgt dabei wie beim ELISA über eine Standardkurve.

In der Regel wurde diese Analysemethode nur für Überstände von aus dem ZNS isolierten Lymphozytenkulturen und parallel dazu von Splenozytenkulturen verwendet. Die Zellkultur erfolgte in 96-Loch-Flachboden-Platten, aus denen der Überstand nach 48 h abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert wurde. Pro Ansatz konnten so die Analyten IL-1a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFN γ , TNF α und GM-CSF gleichzeitig in 25 µl Probe gemessen werden.

Alle Messungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowCytomix Pro 2.2 Software.

2.2.2.6 Proliferationsassays

2.2.2.6.1 CFSE-/Suppressionsassay

Um die Proliferation von lebenden Zellen in einer Kultur bestimmen zu können, wurden die Zielzellen mit Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succimidyl-Ester (CFSE) gefärbt, einem zunächst membrangängigen, nicht-fluoreszierenden Farbstoff mit zwei Acetatgruppen. Diese können

intrazellulär durch endogene Esterasen abgespalten werden, wobei der Farbstoff seine Membrangängigkeit verliert und stark fluoreszierend wird. Die sich teilenden Zellen geben bei jeder ablaufenden Mitose zu gleichen Teilen Farbstoff an die Tochterzellen ab und die Teilungsrate kann so durchflusszytometrisch bestimmt werden. Für die Färbung wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen bevor sie in 10 ml PBS mit 2,5 μM CFSE 5 min bei 37°C inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml FCS abgestoppt, die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und je nach Zellzahl auf 96-Loch-Platten ausgesät. Nach 3 bis 4 Tagen wurden die Zellen geerntet, ggf. mit Oberflächenmarker angefärbt, mit FACS-Puffer gewaschen und am Durchflusszytometer analysiert.

Für einen Suppressionsassay wurden Effektor-T-Zellen mit CFSE gefärbt und zusammen mit ungefärbten Treg in unterschiedlicher Ratio kokultiviert. Nach 3 Tagen wurde die Proliferationsrate anhand der CFSE-Verteilung am Durchflusszytometer untersucht.

2.2.2.6.2 ^3H -Thymidin-Inkorporationsassay

Eine andere Methode zur Bestimmung der Proliferation von Zellen bietet der Proliferationsassay mit radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin. Dabei ist die Menge an inkorporiertem ^3H -Thymidin in der bei der Zellteilung neu synthetisierten DNA direkt proportional zur messbaren Radioaktivität und damit zur abgelaufenen Proliferation in der Kultur.

Die letzten 12 bis 16 h der zu untersuchenden Zellkultur fanden in Anwesenheit von 1,25 μCi ^3H -Thymidin pro Vertiefung statt. Hierzu wurde ^3H -Thymidin in Medium gelöst und 25 μl je 100 μl Medium in eine 96-Loch-Platte gegeben. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Zellerntegerät auf Glasfaserfilterplatten übertragen und nicht-eingebautes ^3H -Thymidin durch mehrmaliges Waschen entfernt. Nach einer 30minütigen Trockenphase wurden die Vertiefungen der Glasfaserfilterplatten mit 20 μl Szintillationsflüssigkeit versehen und die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Beta-Zählers analysiert.

2.2.3 Histologie und Immunzytologie

Für die histologische Untersuchung von murinem ZNS Gewebe wurden Kryostatschnitte von Gehirn und Rückenmark aus PBS oder PFA-perfundierten Mäusen angefertigt. Von den in OCT Tissue Tek eingebetteten Geweben wurden mit Hilfe eines Kryotoms bei -20°C 10 μm dicke Schnitte hergestellt, auf SuperFrost Objektträger übertragen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die mikroskopische Analyse der Schnitte erfolgte am Zeiss Axiophot 2 Mikroskop, das mit der Bildauswertungssoftware MetaVue (Molecular Devices) ausgestattet war.

2.2.3.1 Immunhistochemie

Zur Detektion von eingewanderten CD4⁺ und CD8⁺ Immunzellen in Gehirn und Rückenmark wurden Kryoschnitte von diesen Geweben zunächst wieder aufgetaut, danach 10 min in Acteon bei -20°C fixiert und zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf den Schnitten bei 10 min Inkubation mit 10% BSA in PBS blockiert, bevor der Erstantikörper gegen CD4 oder CD8 in einer Verdünnung von 1:1000 in 1% BSA in PBS für 24 h bei 4°C zugegeben wurde. Nach zweimaligem Waschen wurde endogene Peroxidaseaktivität durch 20 min Inkubation mit Peroxidaseblock inhibiert. Wieder wurde zweimal mit PBS gewaschen, bevor der biotinylierte Zweitantikörper aus Kaninchen mit Reaktivität gegen Ratte 1:100 in 1% BSA in PBS für 1 h bei RT zu den Schnitten gegeben wurde. In der Zwischenzeit wurde aus dem StreptABComplex-Kit DAKO-Lösung nach Anleitung des Herstellers angesetzt und 20 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte mit PBS wurden diese für 30 min mit DAKO-Lösung inkubiert. In der Zwischenzeit wurde DAB-Lösung durch Auflösen einer Tablette in 10 ml destilliertem Wasser, Filtration durch 0,45 µm Porenfilter und Zugabe von 7,5 µl H₂O₂ hergestellt. Diese Lösung wurde anschließend auf die zweimal gewaschenen Schnitte gegeben und bis zu 10 min je nach Farbentwicklung inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Waschen mit destilliertem Wasser abgestoppt und die Schnitte wurden in Aquatex einbettet. Zur Detektion von CD11b⁺ Zellen im ZNS wurde ähnlich wie oben beschrieben verfahren. Allerdings erfolgte die Fixation der Schnitte nach dem Auftauen mit 4% PFA in PBS statt in Aceton und die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5% BSA/0,3% Triton X in PBS für 30 min.

Nach Bedarf erfolgte vor dem Einbetten eine zusätzliche Hämalaunfärbung nach Meyer, wodurch die Zellkerne nach 10 min Inkubation mit Hämalaunlösung und 10 min Inkubation unter fließendem Wasser blau sichtbar gemacht werden konnten.

2.2.3.2 TUNEL-Assay

Mit der TUNEL-Färbung (Terminal transferase dUTP nick end labeling) ist es möglich, während der Apoptose durch Endonukleasen gebildete DNA-Fragmente zu detektieren. Dazu werden an die durch DNA-Strangbrüche entstandenen freien 3'OH-Enden Fluoreszenzfarbstoff-modifizierte Nukleotide in einer enzymatischen Reaktion durch die terminale Transferase gebunden. Anschließend können die markierten Stellen in der DNA mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

Die Anwendung des TUNEL-Assay erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit dem „In situ Cell Death-Detection Kit, TMR red“ (Roche). Parallel zur Inkubation mit TUNEL-Reaktionslösung wurden die Schnitte mit FITC-konjugiertem, 1:50 verdünntem CD4 Antikörper angefärbt und die Zellkerne anschließend mit DAPI markiert.

2.2.4 Tierexperimentelle Methoden

Alle Versuchstiere wurden gemäß den geltenden Richtlinien einer spezifiziert pathogenfreien Tierhaltung im institutseigenen Tierstall bei freiem Zugang zu Futter und Wasser in einem 12 h-Licht/Dunkel-Rhythmus gehalten. Zu Versuchsbeginn waren die verwendeten Mäuse 6 bis 9 Wochen alt. Es lag eine behördliche Genehmigung für alle durchgeführten Tierexperimente vor (Regierung von Unterfranken).

2.2.4.1 Intrazerebrale Injektion von DZ

Diese Methode wurde wie beschrieben durchgeführt (Ling et al., 2006). Zur i.z. Injektion von DC in Versuchstiere wurden diese zunächst mittels intraperitonealer Injektion von 200 µl Anästhetikumlösung betäubt. Mit Hilfe einer Insulinspritze und einem Abstandshalter wurden mit 40 µg/ml MOG₃₅₋₅₅ beladene DZ ($2,5 \times 10^5$ Zellen in 20 µl PBS) oder 20 µl PBS etwa einen Millimeter tief in den rechten Hirnfrontallappen appliziert. Die Spritze wurde vor dem Entfernen etwa 1 min im Gewebe der Maus belassen, um ein unmittelbares Austreten der Injektionsflüssigkeit aus der Injektionsstelle zu vermeiden. Fünf Tage später erfolgte die Induktion einer aktiven EAE.

2.2.4.2 Intravenöse Injektion von DZ

Um die Rolle von B7-H1 auf semi-maturen DZ im Kontext der EAE zu untersuchen, wurden 4 h *in vitro* mit TNFα vorbehandelte und mit 40 µg/ml MOG₃₅₋₅₅ beladene DZ ($2,5 \times 10^6$ pro Maus) intravenös (i.v.) in Empfängertiere injiziert. Dies erfolgte jeweils an Tag -7, -5 und -3 vor EAE Induktion (Tag 0).

2.2.4.3 Induktion von aktiver EAE

Das enzephalitogene Peptid MOG₃₅₋₅₅ (EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) wurde von R. Volkmer (Charite, Berlin, Deutschland) synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt. Zur Herstellung des Immunisierungsgemisches aus Kompletten Freund's Adjuvans (CFA) und MOG-Peptid wurde zunächst inkomplettes Freund's Adjuvans mit *Mycobacterium tuberculosis* (2 mg/ml) zu CFA angereichert. Anschließend wurde in je einer Hamiltonspritze die entsprechende Menge Peptid (2 mg/ml) und CFA aufgenommen, die Lösungen mitein-

ander vermischt und 15 min bei 4°C gelagert. Zur Induktion einer aktiven EAE wurden die Versuchstiere mit Diethylether narkotisiert und anschließend mittels subkutaner Injektion von zweimal je 100 µl Peptid-CFA-Emulsion in die linke und rechte Seite der Schwanzbasis immunisiert. Zusätzlich wurden den Mäusen i.p. 400 ng Pertussistoxin an Tag 0 und Tag 2 nach Immunisierung verabreicht. Die Tiere wurden täglich gewogen und auf klinische Symptome einer EAE anhand folgender Skala untersucht:

Klinischer Schweregrad	Symptome
0	Keine
0,5	Leichte Parese des Schwanzes, proximale 2/3 des Schwanzes waagrecht, Schwanzspitze schleift auf dem Boden, Tier läuft normal
1	Vollständige Schwanzlähmung, kompletter Schwanz schleift auf dem Boden, Tier läuft normal
1,5	Leichte Ataxie, breitbeiniger Gang
2	Milde Paraparese, breitbeiniger, ataktischer Gang, Gesäß tief
2,5	Geringe Paraparese, öfter/immer Wegklappen eines Beines nach hinten
3	Mäßige Paraparese Ein Bein konstant hinten oder beide Beine inkonstant hinten, können nicht mehr unter den Körper gebracht werden
3,5	Paraplegie, beide Beine gelähmt, Gang nur mit den Vorderbeinen
4	Beginnende Tetraparese, erschwertes Voranziehen mit den Vorderbeinen, Aufstützen des Oberkörpers nur auf die Unterarme
4,5	Schwere Tetraparese, Atemnot, moribund
5	Exitus, wegen des Zustands getötet, gestorben

2.2.4.4 Herstellung von Knochenmarkschimären

Zur Untersuchung des differenziellen Beitrags hämatogener versus ZNS residenter Zellen im Kontext der EAE wurden Knochenmarkschimäre aus wt und B7-H1^{-/-} Mäusen hergestellt. Dazu wurden die Empfängertiere subletal (7,5 Gy) oder letal (11 Gy) irradiert und am nächsten Tag mit ca. 2×10^7 i.v. applizierten Knochenmarkszellen naiver wt oder B7-H1^{-/-} Tiere rekonstituiert. Die Rezipienten erhielten ab einer Woche vor Bestrahlung für einen Zeitraum von insgesamt 4 Wochen antibiotikumhaltiges Trinkwasser (Cotrimoxazol). Die Induktion der EAE erfolgte nach weiteren 3 bis 4 Wochen.

2.2.4.5 Perfusion

Um für die histologische und durchflusszytometrische Analyse blutfreies ZNS-Gewebe zu erhalten, wurden die Mäuse mit PBS perfundiert. Dazu wurde nach Tötung des zu präparierenden Tieres mittels CO₂ der Brustkorb eröffnet, das Zwerchfell durchtrennt und über Punktion des linken Ventrikels mit einer 20 G Kanüle ausgeblutet. Anschließend wurden Gehirn und Rückenmark freipräpariert und in PBS auf Eis zur weiteren Aufarbeitung gelagert oder für die Histologie in entsprechende Gefäße mit OCT Tissue Tek eingebettet. Die Lagerung der Gewebeblöcke erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

2.2.4.6 *In vivo* BrdU-Färbung

Zur Detektion proliferierender Zellen *in vivo* wurden den Versuchstieren 18 h vor der Zellernte 2 mg 5`Bromo-2`deoxyuridin (BrdU) in 200 µl PBS i.p. verabreicht. BrdU ist ein synthetisches Thymidinanalogon, das in Zellen der S-Phase anstelle von Thymidin bei der DNA Neusynthese eingebaut wird. Inkorporiertes BrdU wurde anschließend durch Kopplung an fluoreszenzmarkierte Antikörper im Durchflusszytometer nach Angaben des Herstellers detektiert.

2.3 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikwerkzeug des Programms GraphPad Prism 4 bzw. mit dem Programm Microsoft Excel durchgeführt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde beim Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen miteinander der zweiseitige Student's t test angewendet bzw. beim Vergleich von drei oder mehr Gruppen einfaktorielles ANOVA, wobei die Wahrscheinlichkeiten *p<0,05, **p<0,01 und *** p<0,001 als statistisch signifikant gewertet wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Zur Rolle von B7-H1 auf die MOG₃₅₋₅₅-spezifische Immunantwort während der EAE in Peripherie und ZNS

Die genauen Mechanismen der Inhibition durch B7-H1/PD-1 während der verschiedenen Phasen der EAE sind nur unzureichend aufgeklärt. Um dies im klassischen Modell der aktiv induzierten EAE bei C57BL/6 Mäusen zu untersuchen, wurden wt bzw. B7-H1^{-/-} Mäuse gleichen Alters und Geschlechts mit MOG₃₅₋₅₅ in CFA immunisiert und der Krankheitsverlauf dokumentiert. Je nach zu evaluierender Phase der EAE wurden die Tiere anschließend getötet, sekundäre lymphatische Organe und das ZNS entnommen und spezifische Immunantworten analysiert.

3.1.1 Exazerbation des Krankheitsverlaufs in B7-H1^{-/-} Mäusen

Wie Abb. 3.1 und Tabelle 3.1 zeigen, wiesen wt und B7-H1^{-/-} Tiere den typischen Krankheitsverlauf einer monophasischen EAE in MOG₃₅₋₅₅ immunisierten Mäusen auf. Bei wt Mäusen traten erste Krankheitssymptome zwischen Tag 12 bis 15 nach EAE-Induktion auf, erreichten ihr Maximum zwischen Tag 19 und 20 und klangen dann wieder während der Remissionsphase etwas ab. Im Gegensatz dazu führte die systemische Abwesenheit von B7-H1 dazu, dass die Knockout-Tiere früher und schneller erkrankten. Dies äußerte sich in einem früheren Auftreten erster Krankheitssymptome um Tag 9 und einem zeitlich schnelleren Anstieg des Schweregrads der Erkrankung (wt versus B7-H1^{-/-}: 1. Tag der Erkrankung 14,6±1 versus 11,9±1,9, Maximaler Schweregrad der Erkrankung 2,3±0,5 versus 3,3±0,4). Dies korrelierte ebenso mit der Kinetik der Inzidenz: während beispielsweise an Tag 13 nach EAE-Induktion erst 22% der wt Mäuse klinische Symptome aufwiesen, waren dies bei den B7-H1^{-/-} Mäusen bereits 88%. Insgesamt betrachtet unterschied sich jedoch die Inzidenz zwischen beiden Gruppen nicht. Darüber hinaus war die Remissionsphase in wt Mäusen deutlicher ausgeprägt als bei den B7-H1^{-/-} Mäusen, welche einen hohen Schweregrad der Erkrankung beibehielten. Zusätzlich zeigten Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten eine deutlich höhere Mortalität der B7-H1^{-/-} Mäuse (11% versus 0% in wt Mäusen).

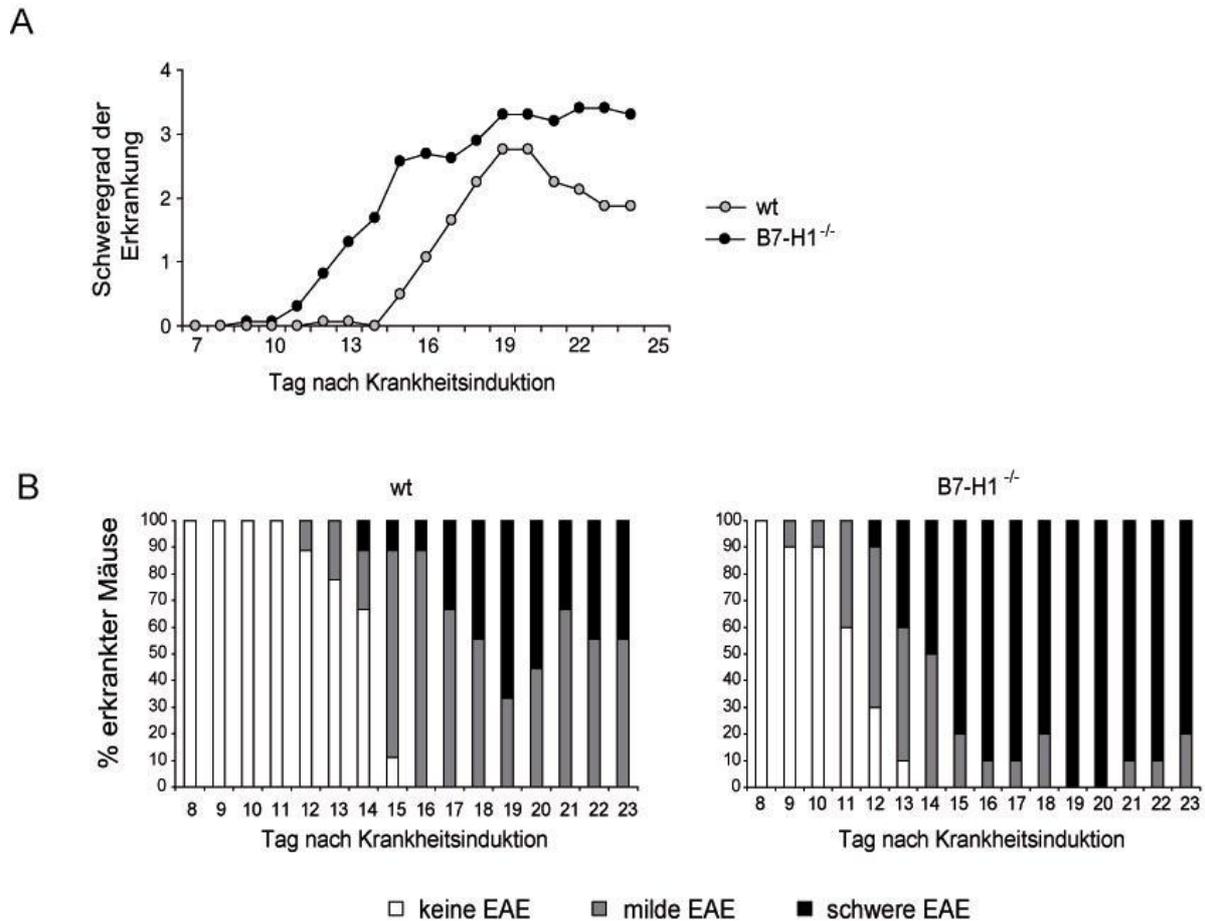


Abb. 3.1: Krankheitsverlauf von MOG₃₅₋₅₅ immunisierten wt und B7-H1^{-/-} Mäusen. Nach Induktion der EAE an Tag 0 wurden die Mäuse täglich auf klinische Symptome untersucht. (A) Durchschnittlicher Schweregrad der Erkrankung je Gruppe und Tag nach EAE-Induktion. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus vier Versuchsreihen. (B) Die grafische Darstellung repräsentiert den jeweiligen Anteil von Mäusen je Gruppe und Tag, der keine klinischen Symptome (weiß) aufweist, mild (Schweregrad $0 < x \leq 2$, grau) bzw. schwer (Schweregrad $x > 2$, schwarz) erkrankt ist. Die Daten von zwei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst.

Gruppe	Inzidenz	1. Tag der Erkrankung ^a	Maximaler Grad der EAE ^b	Median ^c
wt	7/7 (100 %)	14.6 ^{+/-} 1.0	2.3 ^{+/-} 0.5	2.5
B7-H1 ^{-/-}	8/8 (100 %)	11.9 ^{+/-} 1.9	3.3 ^{+/-} 0.4	3
		p = 0.008 ^d	p = 0.01 ^d	

^a Durchschnittlicher Wert für 1. Tag der Erkrankung^{+/-} Standardabweichung.

^b Maximaler Grad der Erkrankung^{+/-} Standardabweichung

^c Median der Maximalwerte für die Erkrankung

Tabelle 3.1: EAE-Induktion in wt und B7-H1^{-/-} Mäusen durch MOG₃₅₋₅₅ Immunisierung. Ein repräsentatives Experiment wurde tabellarisch ausgewertet.

3.1.2 Beschleunigung und Verstärkung der primären, peripheren Immunantwort in B7-H1^{-/-} Mäusen

Als nächstes stellte sich die Frage, inwieweit die T-Zell vermittelte Immunantwort während der EAE durch Abwesenheit von B7-H1 moduliert wurde. Um dies zu beantworten, wurde eine kinetische Untersuchung der peripheren Immunorgane an den Tagen 7, 10, 13 und 17 durchgeführt. Dazu wurden jeweils die Milzen der immunisierten wt und B7-H1^{-/-} Mäuse entnommen, Einzelzellsuspensionen daraus hergestellt und mit 10 µg/ml MOG₃₅₋₅₅ restimuliert. Diese Dosis wurde gewählt, um den auf die T-Zell-Aktivierung inhibitorischen Effekt von B7-H1 auf APZ zu umgehen, der besonders bei geringeren Antigenkonzentrationen eine Rolle spielt (Latchman et al., 2004). Die *ex vivo* Antworten von MOG₃₅₋₅₅ stimulierten T-Zellen wurden mittels ELISA und ELISPOT gemessen, um sowohl die Frequenz Zytokin-sezierender Zellen als auch die absolute Menge des zu untersuchenden Zytokins zu erfassen. Der Fokus lag hierbei auf den zwei proinflammatorischen Zytokinen IFN γ und IL-17, die nachweislich eine wichtige Rolle für Induktion und Verlauf der MOG₃₅₋₅₅-vermittelten Immunantwort spielen (Dong, 2008).

In der präklinischen bzw. frühen klinischen Phase der EAE (Tag 7 bis 10) produzierten bei der Restimulation mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid T-Zellen aus B7-H1^{-/-} Mäusen mehr IFN γ als Zellen aus wt Mäusen (Abb. 3.2 A, B). Auch die im IFN γ ELISPOT ermittelte Anzahl von Zytokin-sezierenden Zellen war in der frühen Phase bei den B7-H1^{-/-} Splenozyten im Vergleich zu wt Kontrolltieren signifikant erhöht (Abb. 3.2 C). Dies deutet auf eine schnellere und verstärkte Aktivierung Antigen-spezifischer Effektor-T-Zellen in der Peripherie von B7-H1^{-/-} Mäusen in der frühen EAE-Phase hin. Im Gegensatz dazu nahm die periphere T-Zell-Antwort an späteren Zeitpunkten wie in der klinischen Phase und am Krankheitsmaximum (Tag 13 bzw. 17 nach EAE-Induktion) bei B7-H1^{-/-} Mäusen ab, während sie in wt Mäusen ihren Höhepunkt erreichte. Indikatoren dafür waren sowohl die erhöhte IFN γ Konzentration im Zellkulturüberstand als auch die höhere Frequenz IFN γ -positiver Spots im ELISPOT (Abb. 3.2 A-C). Für IL-17 konnte eine ähnliche Kinetik wie für IFN γ beobachtet werden, obwohl sich die absoluten Werte für sezerniertes IL-17 zwischen den beiden untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschied (Abb. 3.2 D).

Um nicht nur die proinflammatorischen Th1/Th17-Antworten zu analysieren, sondern auch mögliche Differenzen bei einer Th2-Antwort zu erfassen, wurde in diesen Experimenten auch die IL-4 Produktion von *ex vivo* MOG₃₅₋₅₅ stimulierten Splenozyten im ELISA gemessen. Es zeigte sich allerdings, dass IL-4 zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in keiner der beiden Gruppen detektierbar war (Daten nicht gezeigt).

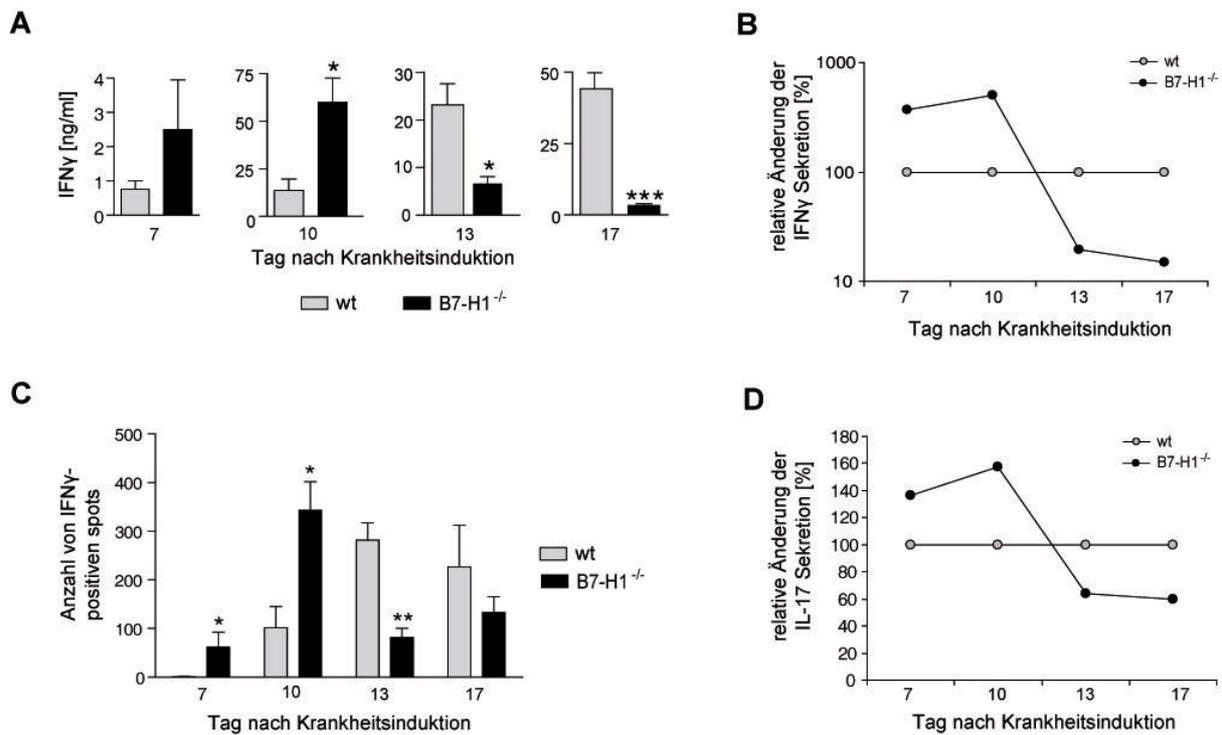


Abb. 3.2: Kinetik der MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Immunantwort von wt und B7-H1^{-/-} Mäusen während der EAE. Wt und B7-H1^{-/-} Mäusen wurde nach Induktion von EAE zu den angegebenen Zeitpunkten die Milz entnommen, Splenozyten gewonnen und diese mit 10 µg/mL MOG₃₅₋₅₅ restimuliert. Die *ex vivo* T-Zellantworten wurden mittels ELISA und ELISPOT analysiert. (A) IFN γ ELISA von für 48 h stimulierten wt bzw. B7-H1^{-/-} Splenozyten aus einem von vier repräsentativen Versuchen (n=3-5 Mäuse pro Gruppe). (B) Vergleich von MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellantwort in wt und B7-H1^{-/-} Mäusen in der Form von relativer Änderung der IFN γ Produktion. Die Werte für wt Mäuse wurden auf 100% normalisiert und die Kinetik der IFN γ Produktion für B7-H1^{-/-} Mäuse in Relation zu wt dargestellt. Die Daten von drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. (C) IFN γ ELISPOT Analyse von mit MOG₃₅₋₅₅ für 24 h restimulierten wt bzw. B7-H1^{-/-} Splenozyten. Auf der y-Achse dargestellt ist die Anzahl positiver Zellen pro 2x10⁵ ausplattierter Splenozyten. (D) IL-17 ELISA von für 48 h stimulierten wt bzw. B7-H1^{-/-} Splenozyten. Der Graph zeigt die relative Änderung der IL-17 Produktion von B7-H1^{-/-} Splenozyten im Vergleich zu wt Splenozyten (100%). Die Daten von zwei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 im Vergleich zu wt

Mittels ELISA und ELISPOT konnte nun zwar die absolute Menge an IFN γ und IL-17 sowie die Frequenz der zytokinsezernierenden Zellen während der Restimulation mit MOG₃₅₋₅₅ bestimmt werden, allerdings blieb die Frage nach dem Zytokin-produzierenden Zelltyp offen. Um zu klären, ob IFN γ und IL-17 hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen oder anderen Immunzellen produziert wurde, wurden die beiden Zytokine intrazellulär angefärbt und mittels Durchflusszytometrie in Kombination mit dem Oberflächenmarker CD4 nachgewiesen. Zum Ausschluss von Spontansekretion diente der Kontrollansatz ohne MOG₃₅₋₅₅. Während der Anteil CD4⁻IFN γ ⁺/CD4⁻IL-17⁺ Zellen bei beiden untersuchten Gruppen nach MOG₃₅₋₅₅ Stimulation sehr gering war (0,75% bzw. 0,65%), zeigte sich ein deutlicher Anstieg im CD4⁺ Kompartiment. Hier sezernierten CD4⁺ Zellen den Großteil des insgesamt produzierten IFN γ

bzw. IL-17. Während die Zytokinproduktion in beiden untersuchten Gruppen bereits im unstimulierten Ansatz etwas erhöht war (2,05% bzw. 2,39%), bewirkte MOG₃₅₋₅₅ Stimulation einen drei- bis vierfachen Anstieg der Zytokin-positiv gefärbten CD4⁺ Zellen (IFN γ : 6% bzw. 8,2%, IL-17: 3,4% bzw. 1,9%). Signifikante Unterschiede zwischen wt und B7-H1^{-/-} Splenozyten konnten hier nicht nachgewiesen werden, da diese Analyse an Tag 12 nach EAE-Induktion durchgeführt wurde und somit in die Phase fällt, in der die Immunantwort in wt Mäusen ansteigt, in B7-H1^{-/-} Mäusen abnimmt und die Effekte somit kompensiert werden.

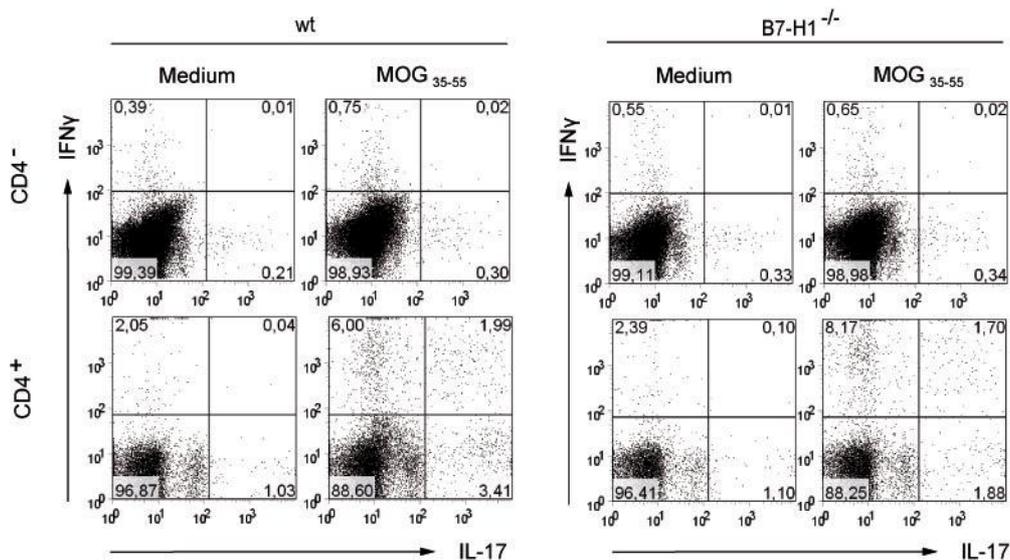


Abb. 3.3: Intrazellulärer Nachweis von IFN γ und IL-17 in MOG₃₅₋₅₅ restimulierten Splenozyten aus EAE-induzierten wt und B7-H1^{-/-} Mäusen. 11 Tage nach Immunisierung der Tiere wurden die Milzzellen isoliert und *in vitro* mit oder ohne 10 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ für 12 h unter Zugabe von Golgi-Stop restimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit CD4 kofärbt, permeabilisiert, fixiert, mit IFN γ bzw. IL-17 Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Im Punktdiagramm dargestellt werden exklusiv lebende Lymphozyten, welche positiv bzw. negativ für CD4 Expression gefärbt wurden. Die inkludierten Zahlenwerte beziehen sich auf die Prozentsätze Zytokin-positiver Zellen unter den CD4⁺ bzw. CD4⁻T-Zellen der korrespondierenden Quadranten. Das Ergebnis jeweils einer von drei untersuchten Mäusen je Gruppe ist dargestellt.

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass im Modell der MOG₃₅₋₅₅ EAE die proinflammatorische, durch IFN γ - und IL-17 Sekretion von aktivierten CD4⁺ T-Zellen vermittelte periphere Immunantwort bei Abwesenheit von B7-H1 beschleunigt und verstärkt ist. Dies korreliert mit dem verfrühten Krankheitsbeginn der B7-H1^{-/-} Mäuse. Allerdings zeigte der Vergleich mit wt Mäusen auch, dass in diesen die periphere Immunantwort länger aufrechterhalten wird, was auf B7-H1 als potenziellen Einflussfaktor auf die Nachhaltigkeit der Funktion peripherer, Antigen-spezifischer Effektor-T-Zellen hinweist.

3.1.3 Charakterisierung des ZNS Milieus in B7-H1^{-/-} Mäusen

3.1.3.1 Erhöhte Immunezellinfiltration im ZNS von B7-H1^{-/-} Mäusen

Nach systemischer Induktion der MOG₃₅₋₅₅ EAE migrieren enzephalitogene T-Zellen aus den peripheren Immunorganen ins ZNS, wo sie auf ihr spezifisches Antigen im Kontext von MHC-Molekülen treffen. Ausgehend von einem transient in der Frühphase der EAE erhöhten Anteil aktivierter T-Zellen in der Peripherie lag die Vermutung nahe, dass auch die Infiltration von Immunzellen im ZNS bei B7-H1^{-/-} Mäusen verstärkt war. Um dies zu untersuchen, wurde EAE-immunisierten Mäusen am Krankheitsmaximum Material aus lumbalem Rückenmark entnommen und für die histologische Analyse zum Nachweis von T-Zellen (CD4⁺, CD8⁺) und Makrophagen/Mikroglia (CD11b⁺) eingesetzt.

Das Rückenmark aus wt Mäusen wies an Tag 17 nach Krankheitsinduktion eine starke Infiltration durch T-Zellen und Makrophagen/Mikroglia auf (Abb. 3.4 A). Ebenso konnten im ZNS Material von B7-H1^{-/-} Mäusen eingewanderte CD4⁺, CD8⁺ und CD11b⁺ Zellen nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung der Infiltrate wurden jeweils 6 Schnitte aus 3 unterschiedlichen Regionen des lumbalen Rückenmarks von 5 Tieren pro Gruppe herangezogen.

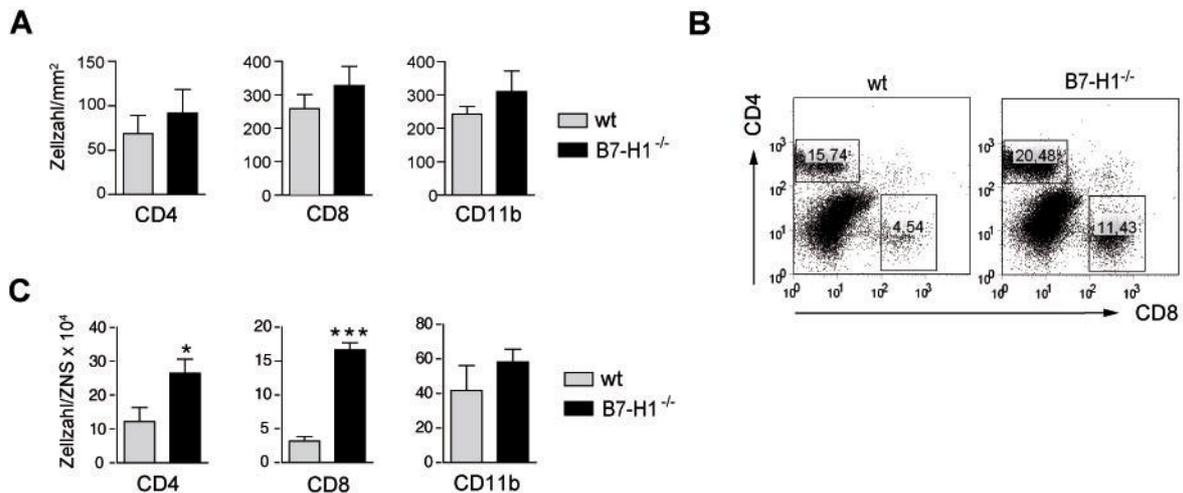


Abb. 3.4: Infiltration des ZNS durch T-Zellen und Makrophagen/Mikrogliazellen von MOG₃₅₋₅₅ immunisierten wt und B7-H1^{-/-} Mäusen am Krankheitsmaximum. (A) Histologische Analyse und Quantifizierung der Infiltrationszellichte in Rückenmarksschnitten von wt und B7-H1^{-/-} Mäusen (n=3 pro Gruppe, Ergebnisse zusammengefasst aus zwei unabhängigen Experimenten). (B) Durchflusszytometrische Analyse CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im ZNS von wt (links) und B7-H1^{-/-} (rechts) Mäusen. Im Punktdiagramm dargestellt werden exklusiv lebende Lymphozyten, die Zahlenwerte repräsentieren den Prozentsatz CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen der ZNS infiltrierenden Lymphozyten (n=3 pro Gruppe, dargestellt ist die Analyse einer repräsentativen Maus). (C) Absolute Anzahl von CD4⁺, CD8⁺ und CD11b⁺ Immunzellen im ZNS von wt und B7-H1^{-/-} Mäusen. Die Kalkulation der spezifischen Zellzahl erfolgte für jede der insgesamt vier analysierten Mäuse je Gruppe anhand der Gesamtlymphozytenzellzahl und dem Prozentsatz positiv gefärbter Zellen unter allen lebenden Lymphozyten. * p < 0,05, *** p < 0,001 im Vergleich zu wt

Wie Abb. 3.4 A zeigt, konnten zwar keine signifikanten Unterschiede in der Infiltration aller drei untersuchten Zelltypen festgestellt werden, jedoch ließ sich ein Trend zu erhöhter Immunzellendichte bei Abwesenheit von B7-H1 ableiten. Da die histologische Quantifizierung von Immunzellen stets methodisch limitiert ist, da nur selektiv ein Teil des Rückenmarks und Gehirns analysiert werden kann, wurde zusätzlich die Anzahl der Immunzellen im Durchflusssytometer analysiert. Dazu wurden wt und B7-H1^{-/-} Mäusen Gehirn und Rückenmark an Tag 17 nach EAE-Induktion entnommen, die Lymphozyten daraus isoliert und deren Gesamtanzahl durch Zellzählung nach Neubauer bestimmt. Die Anzahl der Immunzellen wurde daraus nach dem Anteil der spezifisch für CD4, CD8 und CD11b gefärbten Zellen aus der Gesamtpopulation errechnet. Wie Abb. 3.4 B zeigt, war der Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Populationen gegenüber der Gesamtlmphozytenpopulation in Abwesenheit von B7-H1 deutlich erhöht. Interessanterweise war dieser durch B7-H1 Defizienz hervorherufene Effekt für die CD8⁺ T-Zellpopulation besonders ausgeprägt. Darüber hinaus konnte eine Steigerung der absoluten Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in B7-H1^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Abb. 3.4 C). Im Gegensatz dazu entsprach der Anteil an Makrophagen/Mikrogliazellen in B7-H1^{-/-} Mäusen dem der wt Mäuse.

Aus diesen Daten ergab sich eine direkte Korrelation von T-Zell Infiltration im ZNS und dem klinischen Schweregrad der EAE in wt und B7-H1^{-/-} Mäusen.

3.1.3.2 Apoptose-unabhängige Akkumulation von T-Zellen im ZNS von B7-H1^{-/-} Mäusen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die in B7-H1^{-/-} Mäusen im ZNS beobachtete T-Zell Akkumulation durch verstärkte Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen aus der Peripherie oder durch lokal im ZNS verringerte Apoptose dieser bedingt ist. Dazu wurde die Frequenz apoptotischer CD4⁺ T-Zellen im ZNS mittels TUNEL-Färbung am Krankheitsmaximum untersucht und quantifiziert. In die Berechnung gingen die Anzahl CD4⁺ gefärbter T-Zellen sowie CD4⁺TUNEL⁺ T-Zellen in inflammatorischen Foci des Rückenmarks von MOG₃₅₋₅₅ immunisierten wt bzw. B7-H1^{-/-} Mäusen ein.

Bei dieser Analyse konnten keine Hinweise auf verstärkte Apoptose in wt Mäusen bzw. bessere Protektion von B7-H1^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Abb. 3.5). Folglich scheint Apoptose nicht als primärer Mechanismus an der Erhöhung der T-Zellzahl und Infiltration im ZNS von B7-H1^{-/-} Mäusen beteiligt zu sein.

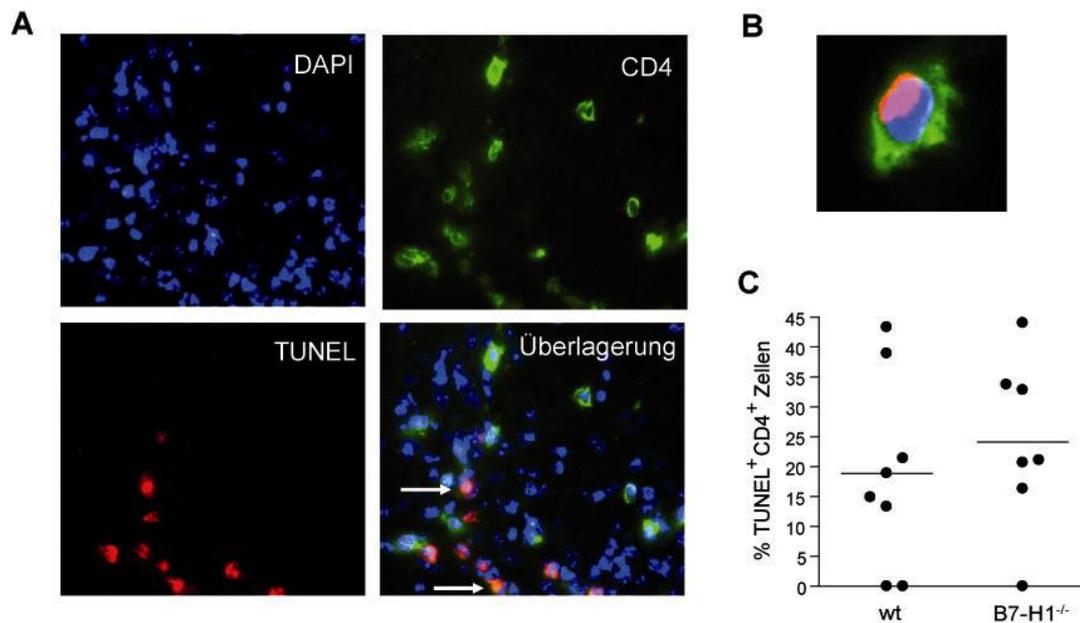


Abb. 3.5: Histologische Analyse und Quantifizierung apoptotischer Zellen in Rückenmarksschnitten von wt und B7-H1^{-/-} Mäusen. Aus MOG₃₅₋₅₅ immunisierten wt und B7-H1^{-/-} Mäusen wurde am Krankheitsmaximum das Rückenmark isoliert und die Infiltration mit CD4⁺ bzw. CD4⁺TUNEL⁺ T-Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. (A) Dargestellt ist eine repräsentative Dreifachfärbung des Rückenmarksschnitt einer B7-H1^{-/-} Maus mit DAPI (blau), CD4 (grün), TUNEL (rot) in Überlagerung (unten rechts). Die Pfeile zeigen auf CD4⁺ TUNEL⁺ T-Zellen. (B) Einzelne, CD4⁺TUNEL⁺ T-Zelle aus dem Rückenmarksschnitt einer wt Maus. (C) Quantifizierung apoptotischer CD4⁺ T-Zellen im ZNS dargestellt als prozentualer Anteil CD4⁺ TUNEL⁺ T-Zellen an insgesamt infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen in den untersuchten inflammatorischen Regionen von Rückenmarksschnitten.

3.1.3.3 Indifferenter Aktivierungsstatus ZNS-isolierter T-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Abwesenheit von B7-H1 den Aktivierungsstatus enzephalitogener T-Zellen in den defizienten Mäusen und dadurch möglicherweise deren Migrationsfähigkeit in das ZNS erhöht, wurde die Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD62L auf T-Zellen am Krankheitsmaximum und in der späten Remissionsphase untersucht. In Kombination erlauben diese Marker eine phänotypische Bestimmung der T-Zellsubpopulationen und der Effektorfunktionen der aus Milz- und ZNS-isolierten Lymphozyten. Für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gilt gleichermaßen, dass CD44⁺ CD62L⁻ Zellen aktivierte Effektorzellen, CD44⁻ CD62L⁺ naive, ruhende T-Zellen und CD44⁺CD62L⁺ Gedächtniszellen darstellen (Abb. 3.6 A).

In der akuten klinischen Phase der EAE waren demnach etwa 90%/96% der aus dem ZNS-isolierten CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen Effektorzellen, während der Anteil dieser Population in der Peripherie nur bei etwa 20% lag (Abb. 3.6 B). Die Hauptimmunzellpopulation in der Milz waren naive CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen (etwa 65%/55%), im ZNS dagegen konnten nur wenige naive CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen (3-4%/1%) nachgewiesen werden. CD4⁺ Gedächtniszellen hatten

einen Anteil von etwa 7% in der Milz gegenüber etwa 4% im ZNS, $CD8^+$ Gedächtniszellen beschrieben peripher eine deutlich größere Population als im ZNS (24% vs. 1%).

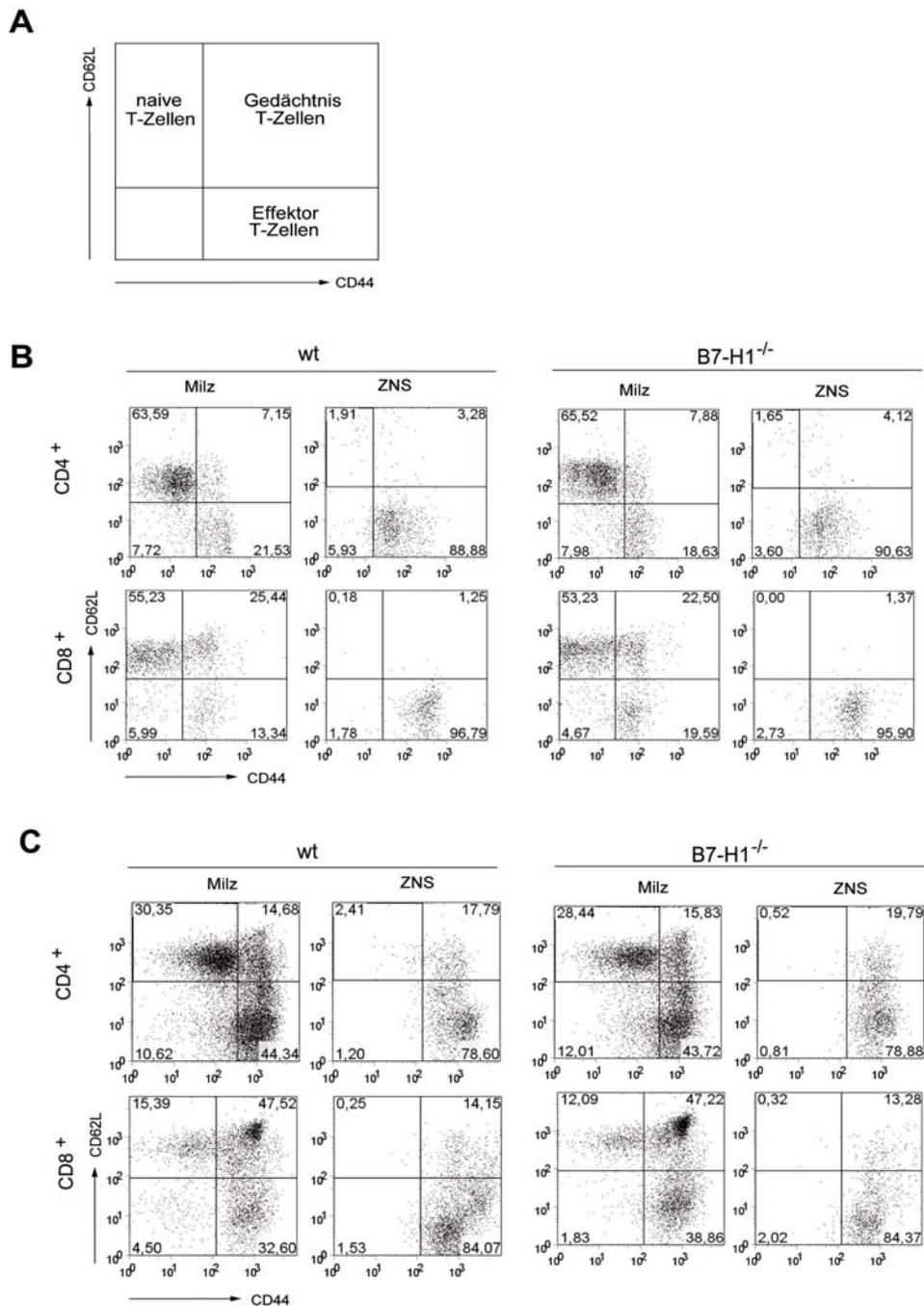


Abb. 3.6: Aktivierungsstatus und Verteilung der T-Zell-Subpopulationen in Milz und ZNS von MOG₃₅₋₅₅ immunisierten wt und B7-H1^{-/-} Mäusen. (A) Schema zur Einteilung von naiven T-Zellen, Effektor- und Gedächtnis T-Zellen anhand ihrer Koexpression von CD44 und CD62L. (B) Durchflusszytometrische Analyse von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in der Milz bzw. im ZNS von wt (linke Seite) und B7-H1^{-/-} (rechte Seite) Mäusen auf Expression von CD44 und CD62L am Krankheitsmaximum. (C) Durchflusszytometrische Analyse von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in der Milz bzw. im ZNS von wt (links) und B7-H1^{-/-} (rechts) Mäusen auf Expression von CD44 und CD62L in der Remissionsphase der EAE. Im Punktdiagramm dargestellt werden exklusiv lebende $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Lymphozyten, die inkludierten Zahlenwerte beziehen sich auf die Prozentsätze in den jeweiligen Quadranten (n=4 pro Gruppe, dargestellt ist die Analyse einer repräsentativen Maus).

Interessanterweise nahm der Anteil an $CD4^+/CD8^+$ Gedächtniszellen im ZNS in der Remissionsphase der EAE jeweils um etwa 14% zu, während der Anteil an aktivierten Effektorzellen auf etwa 79%/84% zurückging (Abb. 3.6 C). In der Peripherie stieg der Anteil von $CD4^+/CD8^+$ Effektorzellen kontinuierlich von etwa 20%/13-20% auf 44%/33-39%, während naive T-Zellen abnahmen (65% auf 30%/ 55% auf 15%). Auffallend war auch, dass sich in der Remissionsphase besonders im $CD8^+$ Kompartiment eine Population von Gedächtniszellen ausbildete, welche mit 47% den größten Anteil aller vorkommenden Subpopulationen einnahm. Zwischen wt und $B7-H1^{-/-}$ Tieren konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in Verteilung bzw. im Aktivierungsstatus der T-Zell-Subpopulationen festgestellt werden.

3.1.3.4 Erhöhte Sekretion proinflammatorischer Zytokine im ZNS von $B7-H1^{-/-}$ Mäusen

Als nächstes stellte sich die Frage, ob neben der bereits beschriebenen Infiltration des ZNS mit Immunzellen die Anzahl Neuroantigen-spezifischer, also MOG_{35-55} -reaktiver T-Zellen im ZNS in Abwesenheit von B7-H1 während der EAE verändert war. Dazu wurden ELISPOT-Analysen mit aus MOG_{35-55} immunisierten wt und $B7-H1^{-/-}$ Mäusen isolierten T-Lymphozyten durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl MOG_{35-55} -spezifischer, $IFN\gamma$ -sezernierender T-Zellen im ZNS von $B7-H1^{-/-}$ Mäusen gegenüber wt Tieren deutlich erhöht war (Abb. 3.7). Dies war sowohl zum Zeitpunkt des Krankheitsmaximums, als auch während der Remission zu beobachten. Auch die Frequenz IL-17-sezernierender MOG_{35-55} -spezifischer T-Zellen war zu beiden untersuchten Zeitpunkten in Abwesenheit von B7-H1 erhöht, wenngleich die Differenz zu wt Mäusen nicht statistisch signifikant war.

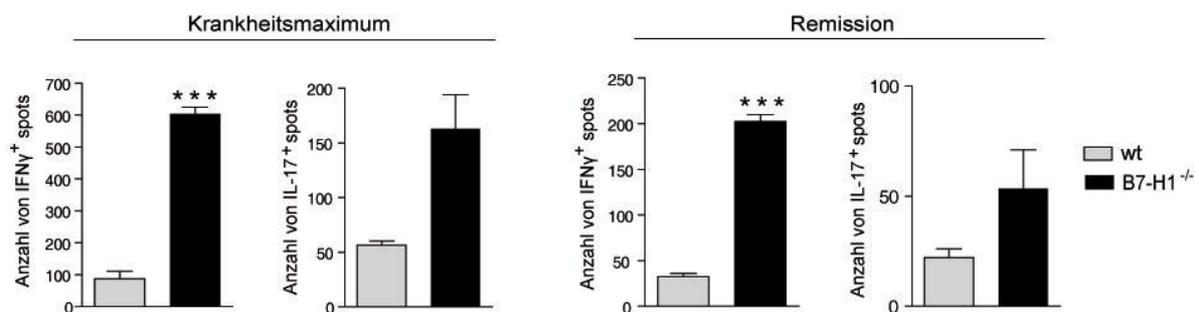


Abb 3.7: Frequenz $IFN\gamma$ - bzw. IL-17-sezernierender, MOG_{35-55} -spezifischer T-Zellen im ZNS von MOG_{35-55} immunisierten wt und $B7-H1^{-/-}$ Mäusen. Am Krankheitsmaximum (linke Seite) bzw. in der Remissionsphase (rechte Seite) wurden ZNS Lymphozyten aus MOG_{35-55} immunisierten wt bzw. $B7-H1^{-/-}$ Mäusen isoliert und *ex vivo* im ELISPOTassay mit 10 $\mu\text{g/ml}$ MOG_{35-55} für 24 h restimuliert. Auf der y-Achse dargestellt ist die Anzahl positiver Zellen pro 5×10^4 ausplattierter Lymphozyten. Ein repräsentatives Experiment von zwei mit jeweils drei Mäusen ist gezeigt. *** $p < 0,001$ im Vergleich zu wt

Somit konnte gezeigt werden, dass ausgehend von einer zeitlich verfrühten Induktion der Immunantwort in der Peripherie die systemische Abwesenheit von B7-H1 zu erhöhter Infiltration des ZNS mit Neuroantigen-spezifischen T-Zellen führt. Im Gegensatz zur Situation nach Antigenstimulation in der Peripherie können ZNS infiltrierende, MOG₃₅₋₅₅-spezifische T-Zellen die induzierte Immunantwort aufrechterhalten und sezernieren auch in späten Erkrankungsphasen nachhaltig erhöhte Mengen proinflammatorischer Zytokine.

3.2 Zur Rolle von B7-H1 auf hämatogenen versus ZNS-residenten Zellen: Untersuchungen an Knochenmarkschimären

In einem spontanen, T-Zell-vermittelten Mausmodell für Diabetes konnten Keir et al. erstmals zeigen, dass B7-H1 Expression auf parenchymalen Zellen einen wesentlichen, protektiven Einfluss auf die Induktion der Autoimmunerkrankung hat (Keir et al., 2006). Eine andere Studie postulierte dagegen, dass primär auf hämatopoetischen Zellen exprimiertes B7-H1 die intrarenale Leukozyteninflammation in einem Nephritismodell limitiert (Menke et al., 2007). Daher sollte in dieser Arbeit die Rolle von B7-H1 auf Zellen hämatopoetischen versus nicht-hämatopoetischen Ursprungs im Zusammenhang der EAE untersucht werden. Eine Chimärisierung zwischen wt und B7-H1^{-/-} Tieren erlaubt dabei im Versuch die Differenzierung zwischen B7-H1 Expression auf peripher im Blut zirkulierenden Zellen und ZNS-residenten Zellen, da letztere strahlungsresistent sind. 6 bis 8 Wochen nach Bestrahlung und Rekonstitution der Rezipienten mit Knochenmark aus wt bzw. B7-H1^{-/-} Mäusen erfolgte die Induktion der EAE.

Zur Konstruktion der Chimären wurde zum einen Knochenmark aus wt Mäusen in durch letale Bestrahlung myeloablatierte B7-H1^{-/-} Mäuse transplantiert, welche nun B7-H1 ausschließlich auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimieren sollten (Abb. 3.8 A). Umgekehrt führte die Transplantation von B7-H1-defizientem Knochenmark in wt Mäuse zur selektiven Expression von B7-H1 auf nicht-hämatopoetischen Zellen. Um zu testen, ob Bestrahlung und Rekonstitution *per se* den Verlauf der EAE in den behandelten Mäusen beeinflussen, wurden als zusätzliche Chimären wt Mäuse mit wt Knochenmark, B7-H1^{-/-} Mäuse mit B7-H1^{-/-} Knochenmark rekonstituiert. Vor Induktion der EAE erfolgte für jede chimalisierte Maus eine durchflusszytometrische Analyse ihres Bluts zur Kontrolle der B7-H1 Expression (Abb. 3.8 B). Wie zu erwarten war, konnte B7-H1 zu einem hohen Prozentsatz in wt → wt bzw. wt → B7-H1^{-/-} Mäusen detektiert werden, während lediglich 7% der peripheren Lymphozyten von B7-H1^{-/-} → wt dieses Molekül auf der Oberfläche trugen. B7-H1^{-/-} → B7-H1^{-/-} Mäuse waren bei dieser Analyse negativ. Keine signifikanten Unterschiede

zwischen den vier untersuchten Gruppen konnten dagegen während der EAE festgestellt werden (Abb. 3.8 C). Zwar traten erste klinische Symptome insbesondere bei $B7-H1^{-/-} \rightarrow B7-H1^{-/-}$ Mäusen und schließlich auch bei $wt \rightarrow B7-H1^{-/-}$ Mäusen etwas verfrühter auf als in den beiden anderen Gruppen, der durchschnittliche Schweregrad der Erkrankung glich sich jedoch bei allen untersuchten Gruppen im Verlauf der EAE an. Zudem trat eine erhöhte Mortalitätsrate und Inhomogenität der Krankheitsverläufe in einer Gruppe auf, so dass keine statistisch signifikanten Unterschiede belegbar waren.

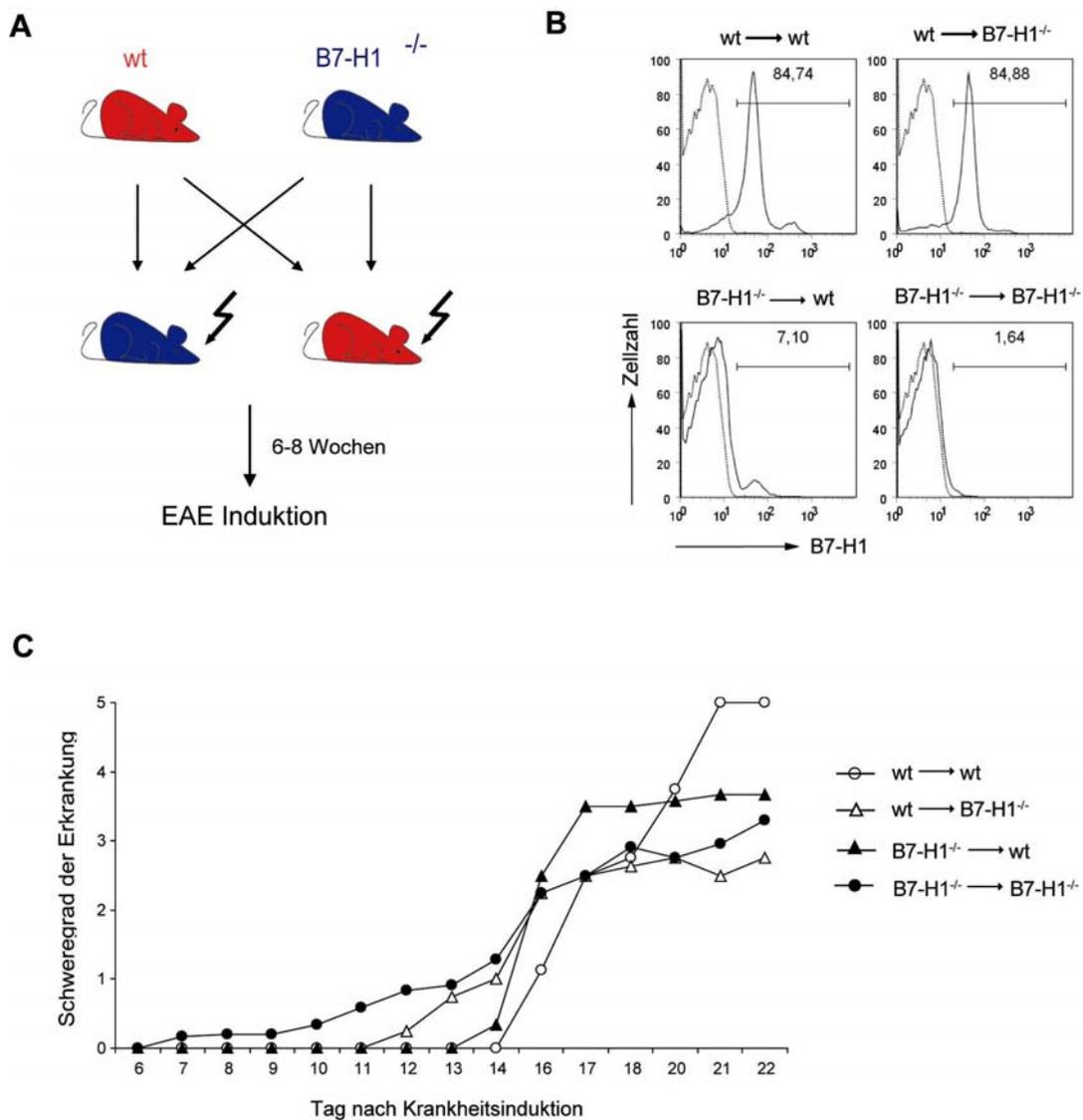


Abb. 3.8: Generierung von wt und $B7-H1^{-/-}$ Knochenmarkschimären und EAE-Verlauf. (A) Schematische Darstellung der Generierung von Knochenmarkschimären. Wt und $B7-H1^{-/-}$ Rezipientenmäuse wurden nach letaler Bestrahlung (11 Gray) mit Knochenmark aus wt und $B7-H1^{-/-}$ Mäusen transplantiert. 6 bis 8 Wochen nach Rekonstitution erfolgt in den Chimären die Induktion von EAE. (B) Durchflusszytometrische Analyse der B7-H1 Expression im Blut 6 Wochen nach Knochenmarkstransplantation. Dargestellt ist je ein repräsentatives Histogramm einer chimersierten Maus pro Transplantationsgruppe, die inkludierten Zahlenwerte geben die Prozentzahl B7-H1-positiver Zellen von allen lebenden Lymphozyten an (gestrichelte Linie: Isotypkontrolle, durchgezogene Linie: B7-H1). (C) Durchschnittlicher Schweregrad der Erkrankung je Gruppe und Tag nach EAE-Induktion ($n=4$ Mäuse pro Gruppe). Dargestellt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

Damit unterschied sich der Verlauf der EAE mit unbehandelten wt und B7-H1^{-/-} Mäusen deutlich von dem Versuchsansatz mit chimeraiserten Mäusen. Möglicherweise werden die Chimären durch das experimentell aufwändige Procedere mit Bestrahlung und Transplantation zu stark beeinträchtigt, was die Anwendung der klassischen MOG₃₅₋₅₅ EAE schwierig macht.

3.3 Zur Rolle von B7-H1 auf APZ *in vitro*: Verstärkte Zytokinsekretion und Proliferation Neuroantigen-spezifischer T-Zellen

In der Peripherie während der Induktionsphase aktivierte und expandierte enzephalitogene T-Zellen verlassen schließlich das lymphoretikuläre Milieu auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen. Während ZNS residente Oligodendrozyten die Zielzellen für MOG₃₅₋₅₅-spezifische T-Zellen darstellen, können diese aufgrund mangelnder MHC II Expression nicht von T-Zellen erkannt werden. Es bedarf für die Reaktivierung von enzephalitogenen, Neuroantigen-spezifischen T-Zellen demnach Neuroantigen-präsentierende APZ, die die Erkennung von Myelinantigenen durch T-Zellen im ZNS vermitteln. Neuere Studien haben gezeigt, dass in erster Linie ZNS-assoziierte DZ wie z.B. perivaskuläre DZ Antigenpräsentation im ZNS mediierten (Greter et al., 2005). Um die funktionelle Konsequenz von B7-H1 Abwesenheit selektiv auf APZ zu untersuchen, wurden *in vitro* Kokulturversuche mit bestrahlten, MOG₃₅₋₅₅ beladenen Splenozyten/DZ aus wt bzw. B7-H1^{-/-} Mäusen in Kombination mit MOG₃₅₋₅₅-spezifischen T-Zellen durchgeführt. Nach 24stündiger Kokultur von T-Zellen und APZ wurde im Überstand die Konzentration von IFN γ gemessen und als Indikator für die Stärke der ausgelösten Immunantwort bewertet.

Sowohl die Abwesenheit von B7-H1 als auch die Neutralisierung des B7-H1/PD-1 Signalwegs durch einen spezifisch B7-H1 blockierenden Antikörper führten zu erhöhten Werten an IFN γ im Zellkulturüberstand (Abb. 3.9 A und B). Dies galt für Splenozyten als „gemischte APZ-Population“ (Abb 3.9 A) ebenso wie für reine, *in vitro* aus Knochenmarksvorläuferzellen differenzierte, professionell APZ wie DZ (Abb. 3.9 B). Antigentitrationsstudien machten darüber hinaus deutlich, dass der inhibitorische Effekt von B7-H1 auf APZ besonders bei niedrigen Antigenkonzentrationen bedeutsam ist. Während bei höheren Peptidkonzentrationen (10 μ g/ml) keine Unterschiede zwischen wt und B7-H1^{-/-} APZ festgestellt werden konnten, war die sezernierte Menge an IFN γ bei 1 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ und 0,2 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ gegenüber wt APZ signifikant erhöht (Abb. 3.9 C).

Um auch die Proliferationsrate MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen nach Kontakt mit Antigenbeladenen wt oder B7-H1^{-/-} DZ zu untersuchen, wurden CD4⁺ T-Zellen aus MOG₃₅₋₅₅

immunisierten Mäusen isoliert und in einem CFSE-Proliferationsassay eingesetzt. Dabei konnten B7-H1 defiziente DZ weitaus effizienter Neuroantigen-spezifische T-Zellen aktivieren und zur Proliferation anregen als wt DZ (Abb. 3.9 D). Der Anteil sich teilender $CD4^+$ T-Zellen wurde ausgehend von 70% im Versuchsansatz mit wt DZ auf 87% durch Abwesenheit von B7-H1 auf APZ erhöht.

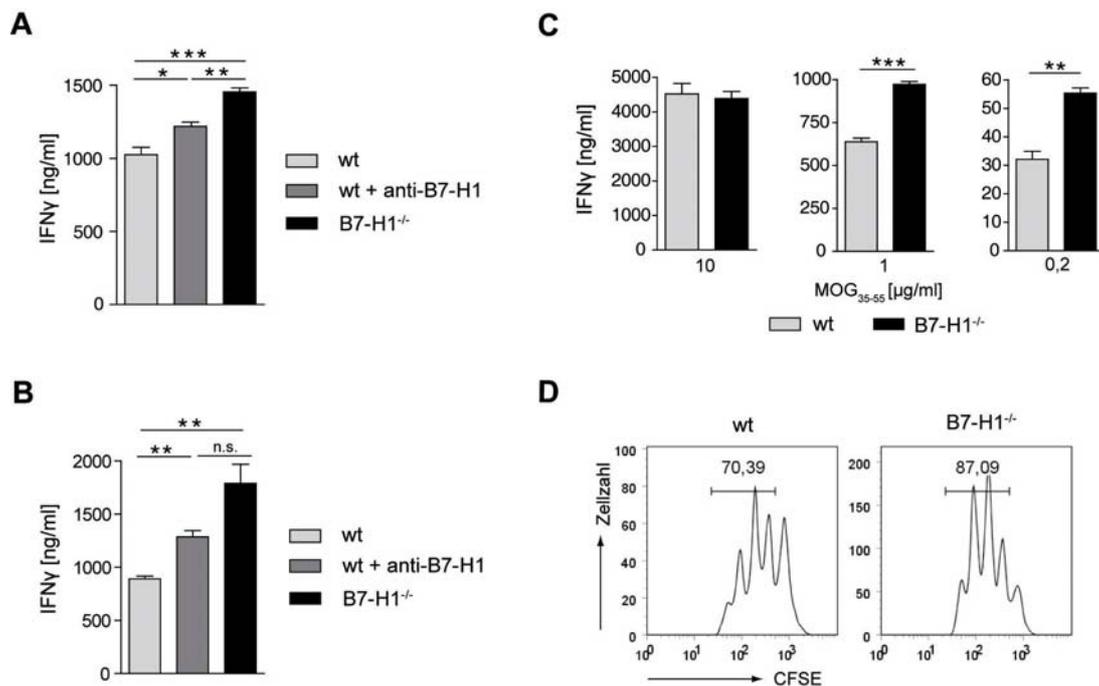


Abb. 3.9: Inhibitorischer Effekt von B7-H1 auf der Oberfläche von APZ auf Aktivierung MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen in Abhängigkeit der Antigenkonzentration. MOG₃₅₋₅₅-spezifische Effektor T-Zellen wurden mit bestrahlten, mit 1 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ beladenen Splenozyten (A) bzw. DZ (B) aus wt bzw. B7-H1^{-/-} Mäusen kokultiviert. Nach 24 h erfolgte die Analyse der IFN γ Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA. Bei Verwendung von wt APZ wurde in den entsprechenden Proben 10 μ g/ml blockierender anti-B7-H1 Antikörper (Klon 10B5) bzw. die korrespondierende Isotypkontrolle zur Kokultur gegeben. Das Balkendiagramm zeigt das Ergebnis eines repräsentativen von drei Experimenten, die Standardabweichungen errechnen sich aus Dreifachbestimmungen. (C) Antigen dosis-abhängiger Effekt der B7-H1 vermittelten Inhibition. MOG₃₅₋₅₅-spezifische Effektor T-Zellen wurden mit bestrahlten, in unterschiedlichen Konzentrationen mit MOG₃₅₋₅₅ beladenen Splenozyten aus wt bzw. B7-H1^{-/-} Mäusen kokultiviert. Nach 24 h wurde die Konzentration an IFN γ im Zellkulturüberstand gemessen. (D) Proliferation MOG₃₅₋₅₅-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen in Antwort auf MOG₃₅₋₅₅ beladene wt und B7-H1^{-/-} DZ. Für die Kokultur wurden $CD4^+$ T-Zellen aus Splenozyten einer EAE-immunisierten wt Maus mittels MACS isoliert, mit CFSE gefärbt und für 4 Tage mit 1 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ beladenen DZ aus wt und B7-H1^{-/-} Mäusen kultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse des CFSE-Profiles mittels Durchflusszytometrie * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ im Vergleich zu wt.

Diese Daten weisen auf eine direkte inhibitorische Funktion von B7-H1 auf APZ bei der Reaktivierung enzephalitogener T-Zellen in Bezug auf IFN γ Sekretion und Proliferation hin. Wie in früheren Studien bereits gezeigt wurde, konnte der inhibitorische Effekt des B7-H1/PD-1 Signalwegs insbesondere bei geringer Antigen dosis belegt werden (Latchman et al., 2001; Latchman et al., 2004).

3.4 Modulation der MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Immunantwort durch intrazerebrale Applikation von APZ

Wie die vorherigen *in vitro* Versuche zeigten, konnten periphere DZ als professionell Antigen-präsentierende Zellen die Aktivierung und Expansion MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen maßgeblich modulieren und B7-H1 stellt als inhibitorisches Molekül auf der Oberfläche von DZ einen weiteren Einflussfaktor auf die Qualität der induzierten Immunantwort dar. Trotz intensiver Studien zur Aufklärung des Beitrags verschiedener Zelltypen zur Antigenpräsentation ist jedoch nicht eindeutig geklärt, welche Rolle unterschiedliche APZ bei der Präsentation von Neuroantigenen im ZNS spielen. Gerade dort ist eine effiziente Reaktivierung von in der Peripherie induzierten T-Zellen durch lokale APZ nötig, um die Migration und Funktionalität enzephalitogener T-Zellen zu ermöglichen. Deswegen sollte in einem Modell mit i.z. APZ-Injektion untersucht werden, welche APZ im ZNS einen relevanten Beitrag zur Pathogenese der EAE leisten.

3.4.1 Verstärkte Proliferation MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen durch unterschiedliche APZ *in vitro*

Zur Analyse der für die EAE Pathogenese wichtigsten APZ im ZNS wurden DZ, Makrophagen und B-Zellen näher untersucht, da diese drei Zelltypen nachweislich Antigenpräsentation während der EAE vermitteln (Bailey et al., 2007; McMahon et al., 2005; Schreiner et al., 2008). Myeloide DZ und Makrophagen wurden nach *in vitro* Differenzierung aus wt Knochenmarksvorläuferzellen gewonnen, indem nach 8 Tagen Kultur vom Boden der Zellkulturschale stark adhärente Makrophagen abgeschabt und die in Suspension befindlichen DZ abgenommen wurden. B-Zellen wurden durch MACS-Anreicherung von CD19⁺ Splenozyten aus Th-transgenen Mäusen gewonnen, welche durch Knockin eines veränderten VDJ Segments am IgH Genlokus MOG-spezifische B-Zellen bilden konnten.

Zunächst wurde in einem *in vitro* Proliferationstest die Kapazität zur Antigenpräsentation für die drei untersuchten Zelltypen bestimmt. Durch Kokultur von MOG₃₅₋₅₅ beladenen DZ, Makrophagen bzw. B-Zellen mit MACS isolierten CD4⁺ T-Zellen aus einer 2D2 Maus konnte so die Fähigkeit der APZ zur Aktivierung von naiven, Antigen-spezifischen CD4 T-Zellen ermittelt werden. In Anwesenheit des bekannten Antigens MOG₃₅₋₅₅ fand bereits ohne APZ eine geringe basale Proliferation der T-Zellen statt. Möglicherweise resultierte dies aus einer Verunreinigung der CD4⁺ T-Zellpopulation durch andere APZ während der MACS-Isolationsprozedur (Abb. 3.10). Mit DZ als APZ konnte dagegen eine Steigerung der T-Zellproliferation um Faktor 3 erreicht werden, welche bei einer größeren CD4:APZ Ratio

zusätzlich erhöht wurde (etwa Faktor 3,5). Im Gegensatz dazu erwiesen sich B-Zellen als weniger potente APZ mit einer Erhöhung der CD4⁺ T-Zellproliferationsrate um etwa das 1,5fache vom Ausgangswert ohne zusätzliche APZ, während Makrophagen in diesem Versuch überraschenderweise keine T-Zellen zur Proliferation anregen konnten.

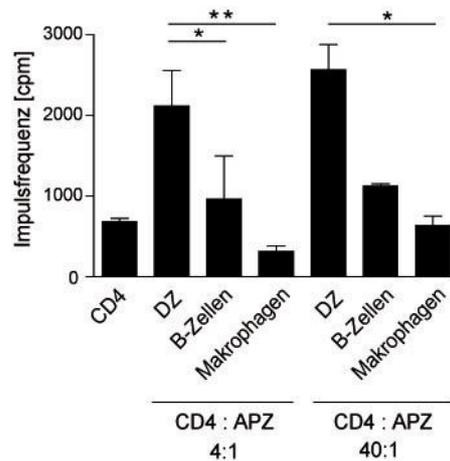


Abb. 3.10: Proliferationstest zur Bestimmung der Antigenpräsentationskapazität verschiedener APZ. Aus wt Mäusen isolierte DZ und Makrophagen sowie aus einer Th-transgenen Maus isolierte CD19⁺ B-Zellen wurden mit naiven, MOG₃₅₋₅₅-spezifischen CD4⁺ T-Zellen bei einer CD4:APZ-Ratio von 4:1 bzw. 40:1 für 3 Tage kokultiviert. Während der letzten 16 h der Kokultur wurde ³H-Thymidin zugegeben und die Proliferation der T-Zellen gemessen. * p < 0,05, ** p < 0,01 im Vergleich zu DZ

3.4.2 Differenzieller Beitrag verschiedener intrazerebraler APZ zur EAE-Pathogenese

Für die *in vivo* Experimente wurden je $2,5 \times 10^5$ APZ *in vitro* mit LPS maturiert, mit MOG₃₅₋₅₅ beladen und i.z. in wt Empfängermäuse appliziert, die EAE Induktion erfolgte 5 Tage später. Bereits 10 Tage nach MOG₃₅₋₅₅ Immunisierung konnten bei DZ-injizierten Mäusen erste klinische Symptome festgestellt werden (Abb. 3.11 A). An Tag 11 und 12 erkrankten die ersten B-Zellen bzw. Makrophagen-injizierten Tiere, während einen Tag später auch Tiere der PBS-Kontrollgruppe klinische Symptome aufwiesen. Im Verlauf der Erkrankung dagegen konnten zwischen den untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich maximalem Schweregrad der EAE, Inzidenz, Mortalität und Remission festgestellt werden. Somit spielte das Vorhandensein unterschiedlicher APZ im ZNS hauptsächlich während der Induktionsphase der EAE eine exazerbierende Rolle. Bei genauerer statistischer Analyse des Startzeitpunktes der EAE innerhalb der untersuchten Gruppen zeigte sich, dass DZ und B-Zellen den Beginn der Erkrankung am meisten beschleunigten, während das Vorhandensein von Makrophagen keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung klinischer Symptome

der EAE hatte (Abb. 3.11 B). DZ erwiesen sich demnach als die potentesten APZ im ZNS, die den Krankheitsbeginn der EAE maßgeblich beeinflussten.

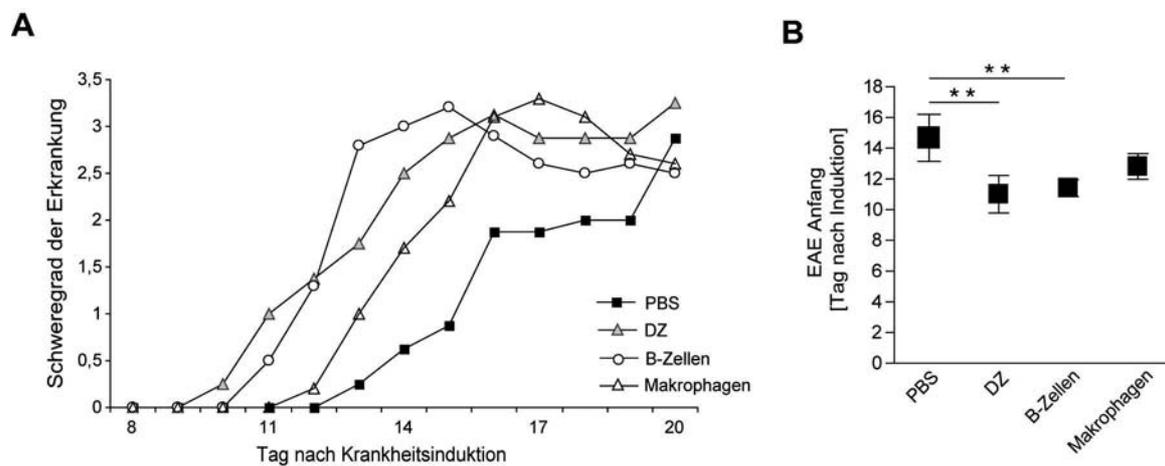


Abb. 3.11: Krankheitsverlauf von wt Empfängermäusen nach i.z. APZ Applikation und MOG₃₅₋₅₅ Immunisierung. 5 Tage nach i.z. Applikation von PBS, $2,5 \times 10^5$ DZ, B-Zellen bzw. Makrophagen wurde in den Mäusen EAE induziert und diese täglich auf klinische Symptome untersucht. (A) Durchschnittlicher Schweregrad der Erkrankung je Gruppe und Tag nach EAE-Induktion. (B) Grafische Darstellung des durchschnittlich ersten Tages mit Auftreten klinischer Symptome der Erkrankung nach MOG₃₅₋₅₅ Immunisierung. ** $p < 0,01$ im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe

3.4.3 Erhöhte Immuneinfiltration und Th1-Polarisation im ZNS DZ-injizierter Mäuse

Weiterer Bestandteil der Analyse der mit unterschiedlichen APZ injizierten Mäuse war die Untersuchung der T-Zell-Infiltration und die Reaktivität MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen im ZNS. Da bereits im späten präklinischen Stadium Immuneinfiltration im ZNS zu erwarten sind und die unterschiedlichen APZ besonders den Beginn der EAE modulieren, erfolgte die Analyse von ZNS Material an Tag 9 nach Krankheitsinduktion.

Die prozentual größte Population an CD4⁺ T-Zellen gemessen im Verhältnis zu allen im ZNS vorhandenen Lymphozyten war mit etwa 9% bei den Mäusen der DZ-injizierten Gruppe zu beobachten, während die B-Zell-Gruppe nur etwa 2% CD4⁺T-Zellen im ZNS aufwies (Abb. 3.12 A). In der PBS-Kontrollgruppe konnten zu diesem frühen Zeitpunkt keine CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen detektiert werden, was darauf hinweist, dass die i.z. Injektion *per se* nicht zur Rekrutierung von Immuneinfiltration an die Injektionsstelle im ZNS führt. Interessanterweise war bei den mit Makrophagen-injizierten Mäusen die ZNS Population für CD4⁺ T-Zellen mit etwa 6% im Vergleich zur Kontrollgruppe mäßig erhöht, wohingegen hier die größte Population CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnte (3%). Mit Werten um 1% war diese Immuneinfiltration in PBS- und B-Zell-injizierten Mäusen nach der entsprechenden Injektion unverändert, in DZ-injizierten Mäusen leicht erhöht (2,5%).

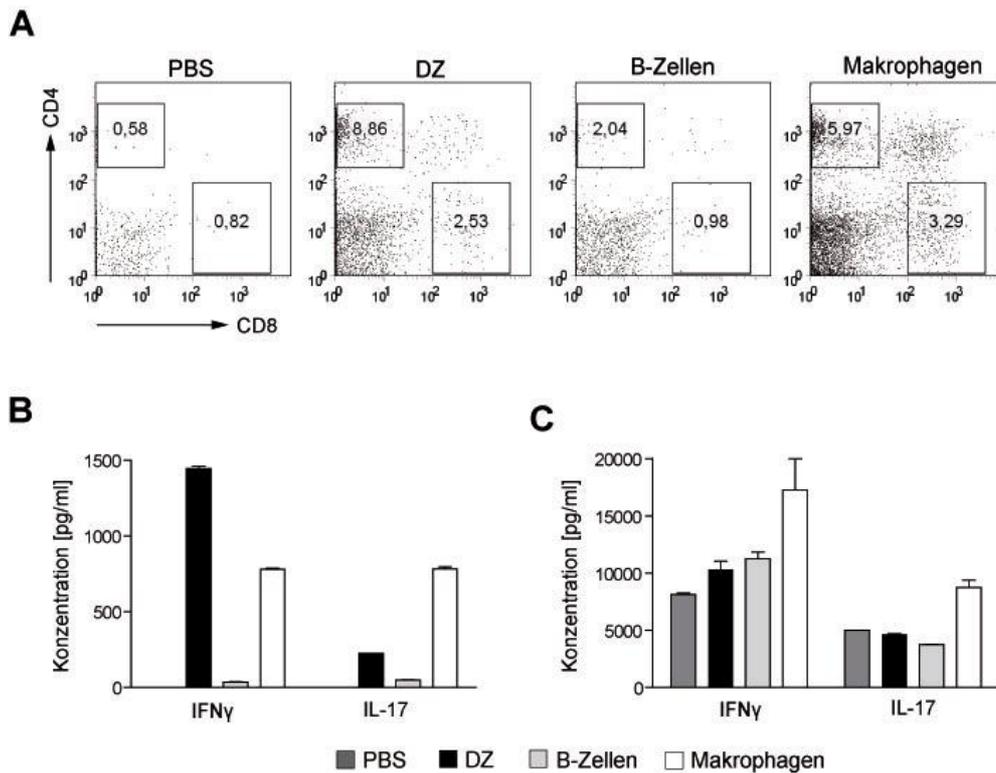


Abb. 3.12: Charakterisierung der ZNS-Immuneinfiltration und der MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Immunantwort von i.z. APZ-injizierten Mäusen. (A) 9 Tage nach EAE-Induktion wurde den wt Empfängermäusen Rückenmark und Gehirn entnommen, die Lymphozyten daraus isoliert und durchflusszytometrisch auf Infiltration mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht. In den Punktdiagrammen dargestellt werden exklusiv lebende Lymphozyten, die Zahlenwerte repräsentieren den Prozentsatz CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen der ZNS infiltrierenden Lymphozyten. (B, C) Analyse Th1/Th17-polarisierter Immunantworten MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen an Tag 9 nach EAE Induktion. Aus Hirn und Rückenmark isolierte ZNS-Lymphozyten (B) bzw. Splenozyten (C) wurden mit 10 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ für 24 h restimuliert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der IFN γ und IL-17 Konzentration im Zellkulturüberstand mittels CBA.

Zusätzlich wurde die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN γ und IL-17 durch MOG₃₅₋₅₅-spezifische T-Zellen in der Peripherie und im ZNS untersucht. Besonders aus dem ZNS von DZ-injizierten Mäusen isolierte MOG₃₅₋₅₅-spezifische T-Zellen produzierten erhöhte Mengen an IFN γ und IL-17 im Vergleich zu T-Zellen aus der PBS-Kontrollgruppe, bei welchen zu diesem Zeitpunkt keine Zytokine nachweisbar waren (Abb. 3.12 B). Die detektierte Konzentration an IFN γ in der mit DZ-injizierten Mäusen war mit 1465 pg/ml etwa doppelt so hoch wie die in der mit Makrophagen-injizierten Gruppe (780 pg/ml), während in der B-Zell-Gruppe lediglich 36 pg/ml IFN γ sekretiert wurden. Ähnlich geringe Konzentrationen konnten in dieser Gruppe auch für IL-17 nachgewiesen werden (49 pg/ml). Makrophagen-injizierte Mäuse sezernierten mit 781 pg/ml etwa dreimal mehr IL-17 als Mäuse aus der DZ-injizierten Gruppe (224 pg/ml). Gleichzeitig produzierten Makrophagen-injizierte Mäuse auch gegenüber den anderen drei untersuchten Gruppen erhöhte Mengen an peripherem IFN γ (Faktor 1,8) und IL-17 (Faktor 2) (Abb. 3.12 C).

Bemerkenswert ist zudem, dass in Mäusen der PBS-Kontrollgruppe in der Peripherie vergleichbare Immunantworten nach Stimulation mit MOG₃₅₋₅₅ erzeugt werden konnten, während zu diesem Zeitpunkt noch keine Neuroantigen-spezifischen T-Zellen im ZNS detektierbar waren (Abb. 3.17 B und C).

Daraus resultierte für DZ-injizierte Mäuse ein ZNS-Milieu, das einen ausgeprägten Th1-Phänotyp aufwies, während Makrophagen-Injektion die Polarisation von Th1- und Th17-Zellen in etwa gleichem Maße induzierte. Nach B-Zellinjektion konnten ebenfalls Th1-/Th17-Immunantworten nachgewiesen werden, hier jedoch deutlich schwächer als in den anderen beiden APZ-Gruppen. Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass DZ als potenteste der untersuchten APZ-Populationen zur verstärkten Initiation und Exazerbation der EAE durch effizientere Rekrutierung und Polarisation zu Th1/Th17 Effektorzellen beitragen.

3.5 Zur Rolle von B7-H1 auf DZ *in vivo*: Modulation der MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Immunantwort durch intravenöse Applikation tolerogener DZ

An der Schnittstelle zwischen ZNS und Immunsystem tragen DZ direkt zur Aufrechterhaltung der ZNS Immunität bei und sind maßgeblich an der Entwicklung von ZNS Autoimmunität und Inflammation beteiligt (Greter et al., 2005; McMahon et al., 2005). In diesem Zusammenhang zeigten Studien, dass *in vitro* generierte DZ je nach Differenzierungsgrad und Applikationsform *in vivo* immunogen oder tolerogen wirken können (Menges et al., 2002; Weir et al., 2002). Da die vorhergehenden Experimente zeigten, dass B7-H1 auf immunogenen APZ für die T-Zell-Aktivierung eine wichtige inhibitorische Rolle spielt, sollte untersucht werden, wie B7-H1 zur Funktionalität tolerogener DZ beiträgt. Dazu wurden Knochenmarksvorläuferzellen aus wt und B7-H1^{-/-} Zellen isoliert, *in vitro* zu DZ differenziert und mit TNF α zu semi-maturen DZ nach Menges et al. ausgereift (Menges et al., 2002). So mit TNF α -vorbehandelte tolerogene DZ (TNF α -DZ) wurden anschließend in wt Mäuse i.v. appliziert und der EAE-Verlauf untersucht.

3.5.1 Zelloberflächen-Phänotyp TNF α - und LPS-maturierter DZ

Vorarbeiten mit TNF α -behandelten, semi-maturen DZ konnten zeigen, dass deren Phänotyp ähnlich dem von mit LPS voll maturen DZ (LPS-DZ) ist, das Zytokinmuster sich jedoch deutlich unterschied. Um auszuschließen, dass die Abwesenheit von B7-H1 *per se* die Frequenz von für die Antigenpräsentation wichtigen Oberflächenmolekülen verändert, wurde der Phänotyp von mit LPS maturierten- vs. TNF α -DZ aus wt bzw. B7-H1^{-/-} Mäusen durch-

flusszytometrisch untersucht. Dabei konnten für alle untersuchten Moleküle MHC I, MHC II, CD205, CD40, CD80 und CD86 keine auffallenden Differenzen zwischen den beiden untersuchten Gruppen festgestellt werden (Abb. 3.13). Es konnte gezeigt werden, dass die Reifungsstimuli LPS und TNF α eine vergleichbare Expression von MHC-Molekülen oder anderen kostimulatorischen Molekülen hervorrufen. Darüberhinaus exprimierten sowohl TNF α -DZ wie LPS-DZ ein hohes Maß an B7-H1, was wiederum die Grundlage für die nachfolgenden Experimente zur Untersuchung der Rolle von B7-H1 auf DZ bildete.

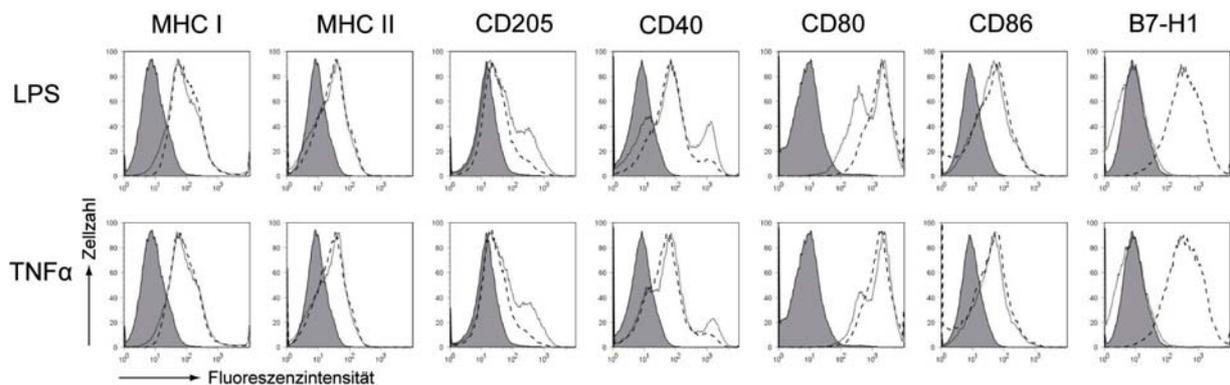


Abb. 3.13: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker auf LPS- bzw. TNF α maturierten DZ. Der Phänotyp von aus wt (gestrichelte Linie) und B7-H1 $^{-/-}$ (durchgezogene Linie) Mäusen differenzierten DZ wurde mittels Durchflusszytometrie durch spezifische Färbung von MHC I, MHC II, CD205, CD40, CD80, CD86 und B7-H1 im Vergleich zu den korrespondierenden Isotypkontrollen (ausgefüllte Linie) bestimmt. Die Inkubation mit 5 μ g/ml LPS bzw. 500 U/ml TNF α erfolgte 24 h vor der Analyse.

3.5.2 Effektivere Protektion gegen EAE in wt Mäusen nach intravenösem Transfer B7-H1 defizienter TNF α -DZ

Diese Versuche wurden in enger Kooperation mit Prof. Manfred Lutz und Carolin Geus (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) durchgeführt.

Für diese Versuche wurden *in vitro* Knochenmarksvorläuferzellen in 6-10 Tagen unter GM-CSF zu DZ ausdifferenziert, 4 h vor Injektion mit TNF α ausgereift sowie mit 40 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ beladen, und anschließend 7, 5 und 3 Tage vor EAE Induktion i.v. in wt Mäuse injiziert (Abb. 3.14 A). Die Kontrollgruppe mit PBS-injizierten wt Mäusen entwickelte im Zeitverlauf ausgeprägte klinische Symptome einer EAE, während Mäuse mit 2×10^6 gespritzten TNF α -DZ[wt] weniger stark, mit 3×10^6 TNF α -DZ[wt] kaum mehr von der EAE betroffen waren (Abb. 3.14 B). Im Gegensatz dazu konnte vollständige Protektion gegen EAE durch Injektion von 2×10^6 bzw. 3×10^6 TNF α -DZ[B7-H1 $^{-/-}$] erreicht werden. Dieses Titrationsexperiment demonstrierte zum einen, dass die gleiche Menge an TNF α -DZ[wt] und TNF α -DZ[B7-H1 $^{-/-}$] bedingt durch die verstärkte protektive Kapazität von TNF α -DZ[B7-H1 $^{-/-}$] den

Verlauf der EAE unterschiedlich beeinflusst. Zum anderen konnte ermittelt werden, dass etwa $2,5 \times 10^6$ TNF α -DZ pro Injektion optimal sind, um die Unterschiede im Wirkmechanismus zwischen TNF α -DZ[wt] und TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] abbilden zu können. Für alle weiteren Experimente wurden demnach pro Injektion $2,5 \times 10^6$ TNF α -DZ verwendet. Um zu untersuchen, ob die TNF α -DZ-vermittelte Protektion gegen EAE in Abhängigkeit von Neuroantigenen auf der Oberfläche der DZ stattfindet, wurden wt Empfängermäuse mit PBS, MOG₃₅₋₅₅ unbeladenen TNF α -DZ[wt] und TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] injiziert und der EAE-Verlauf beobachtet. Im Gegensatz zu MOG₃₅₋₅₅ präsentierenden TNF α -DZ konnten in diesem Versuchsansatz keine EAE-protaktiven Effekte in den TNF α -DZ-Empfängermäusen gegenüber PBS-injizierten Mäusen festgestellt werden (Abb. 3.14 C).

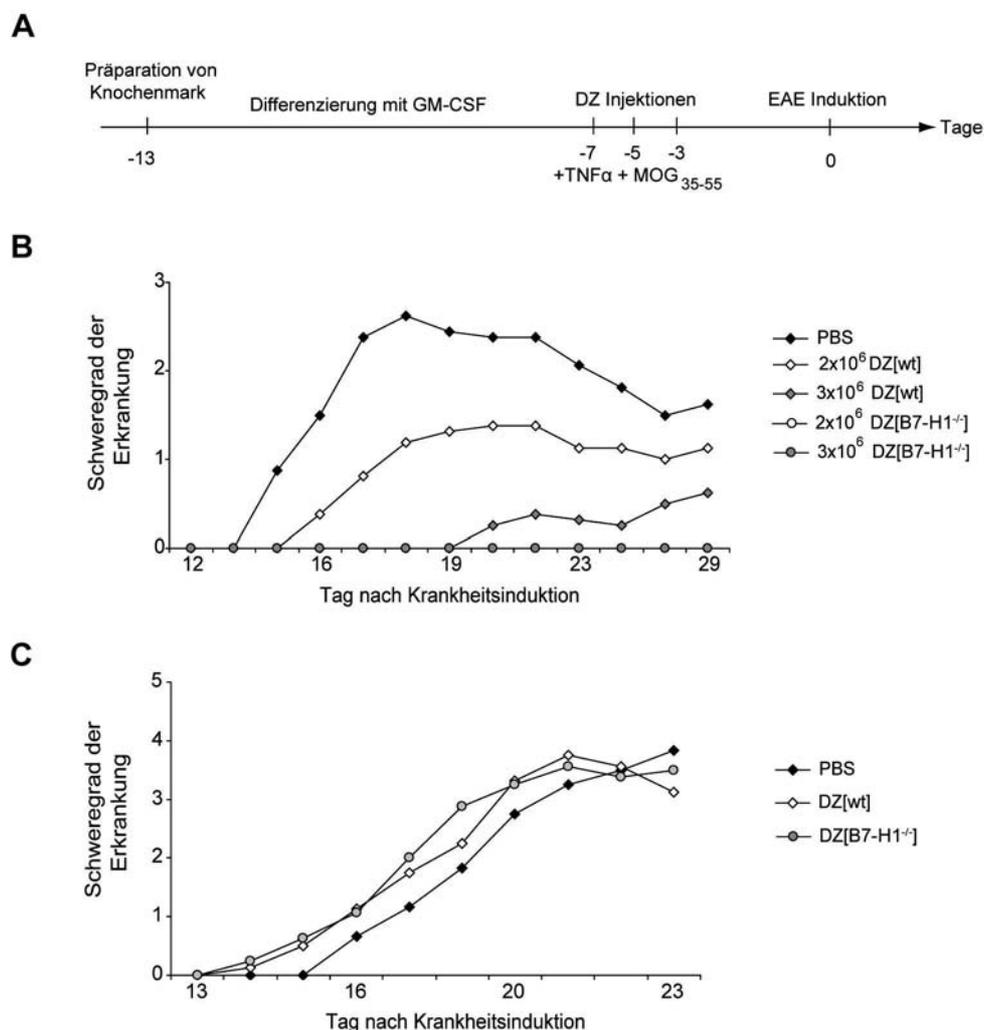


Abb. 3.14: Effizientere Protektion vor EAE durch repetitive Injektion von TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] im Vergleich zu TNF α -DZ[wt] in wt Empfängermäusen. (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. (B) Durchschnittlicher Schweregrad der Erkrankung je Gruppe und Tag nach EAE-Induktion. Dargestellt ist ein TNF α -DZ-Titrationsexperiment (n=4 pro Gruppe). Der protektive Effekt von $2,5 \times 10^6$ TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] konnte in mindestens drei unabhängigen Experimenten gezeigt werden (n=4-6 pro Gruppe). (C) Durchschnittlicher Schweregrad der Erkrankung nach Injektion MOG₃₅₋₅₅ unbeladener TNF α -DZ bzw. PBS in wt Empfängermäuse (n=4 pro Gruppe).

3.5.3 Verstärkte Aktivierung von Th2-/Tr1-Zellen durch B7-H1^{-/-} TNF α -DZ in der Peripherie

Um die durch die EAE-Immunisierung induzierte Immunantwort gegenüber dem bekannten Neuroantigen und den Einfluss von TNF α -DZ darauf zu untersuchen, wurden von den PBS, TNF α -DZ[wt] und TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] injizierten Mäusen an Tag 10 nach EAE-Induktion Splenozyten isoliert, diese mit unterschiedlichen Konzentrationen von MOG₃₅₋₅₅ für 96 h inkubiert und anschließend das Zytokinprofil ermittelt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den proinflammatorischen Zytokinen IFN γ und IL-17. Außerdem wurde die Konzentration von IL-10 und IL-13 nach Peptid-Restimulation der spezifischen Immunzellen untersucht, da frühere Studien zur Wirkungsweise von TNF α -DZ auf eine protektive Rolle von IL-10 bedingt durch Induktion Antigen-spezifischer, IL-10-produzierender CD4⁺ T-Zellen (Tr1-Zellen) und von IL-13 durch Induktion von Th2-Zellen hinwiesen (Menges et al., 2002; Wiethe et al., 2007).

Die Daten zeigten, dass die Menge von Tr1/Th2-typischen Zytokinen IL-10 und IL-13 nach TNF α -DZ[wt] und TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] Injektion im Gegensatz zur PBS-injizierten Kontrollgruppe stark erhöht war (Abb. 3.15). Interessanterweise war dies auch ohne MOG₃₅₋₅₅ Stimulation in den TNF α -DZ[wt] und TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten Mäusen der Fall, was auf eine durch die TNF α -DZ-Immunisierung *per se* erhöhte Anzahl von aktivierten Tr1- bzw. Th2-Zellen hinweist. Nur durch starke Antigenstimulation mit 20 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ konnte dieser Effekt noch gesteigert werden. Für IL-10 und IL-13 konnte gezeigt werden, dass durch die Abwesenheit von B7-H1 auf TNF α -DZ eine verstärkte Aktivierung und Zytokinsekretion von T-Zellen stattfindet, die für die Vermittlung der EAE-Protektion wichtig sind. Im Vergleich zu TNF α -DZ[wt] wurde bei niedrigerer Antigenosis eine Steigerung um etwa Faktor 1,5 für IL-10, für IL-13 sogar um Faktor 3 durch TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] erzielt. Im Gegensatz dazu resultierte die Abwesenheit von B7-H1 auf TNF α -DZ in einer Reduktion der Konzentration proinflammatorischer Zytokine wie IL-17 bzw. IFN γ . Auffallend war hier, dass die Immunantwort von Th1/Th17-Zellen strikt Neuroantigen-abhängig war, da ohne oder bei geringer Antigenkonzentrationen kaum Zytokine nachgewiesen werden konnten. Während TNF α -DZ[wt]-Injektion lediglich zur partiellen Restriktion IL-17-produzierender T-Zellen führte (bei Stimulation mit 20 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ für PBS: 766 \pm 5 pg/ml, DZ[wt]: 648 \pm 22 pg/ml, DZ[B7-H1^{-/-}] 464 \pm 9 pg/ml), hatten TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] sowohl auf die Konzentration von IL-17 als auch von IFN γ inhibierenden Einfluss (bei Stimulation mit 20 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ für PBS: 3255 \pm 214 pg/ml, DZ[wt]: 3204 \pm 105 pg/ml, DZ[B7-H1^{-/-}]: 2370 \pm 67 pg/ml).

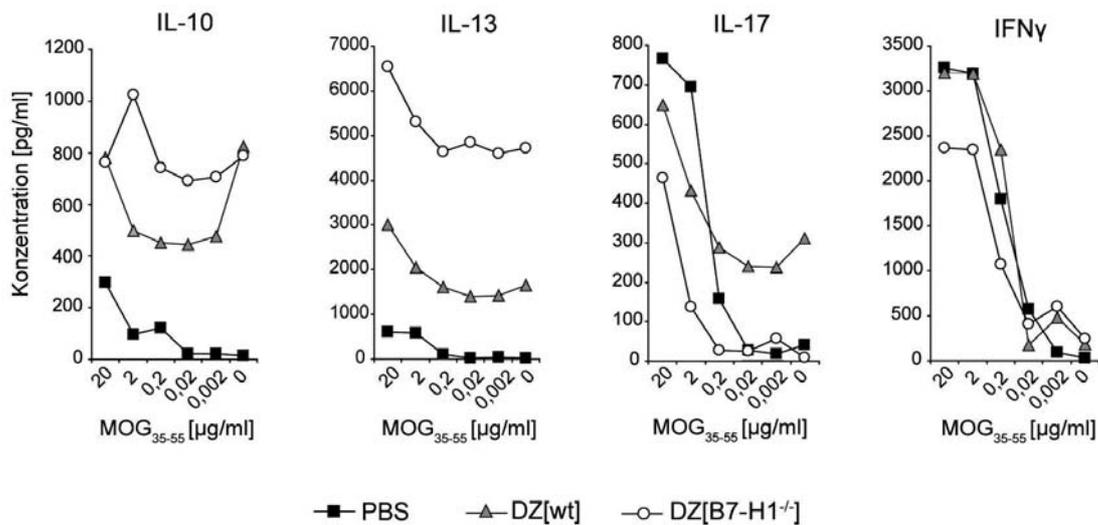


Abb. 3.15: Charakterisierung der primären, MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Immunantwort in TNF α -DZ injizierten Mäusen an Tag 10 nach EAE-Induktion. Wt Empfänger-mäusen mit PBS, TNF α -DZ[wt] bzw. TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] wurde die Milz entnommen, Splenozyten gewonnen und diese mit unterschiedlichen Konzentrationen an MOG₃₅₋₅₅ restimuliert. Die *ex vivo* T-Zellantworten wurden nach 96 h Inkubation mittels ELISA im Zellkulturüberstand analysiert. Die Abbildung zeigt Daten aus einem repräsentativen Experiment mit je 4 Mäusen pro Gruppe, wobei die Zellkulturüberstände für die ELISA Analyse aus Dreifachbestimmungen vereinigt wurden.

Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass durch die TNF α -DZ-Injektionen ein protektives Tr1-/Th2-Zytokin Umfeld geschaffen wird, welches durch Abwesenheit von B7-H1 auf TNF α -DZ noch verstärkt wird und zur Restriktion proinflammatorischer, die EAE induzierender autoreaktiver T-Zellen beiträgt.

3.5.4 Reduzierte Frequenz CD4⁺FoxP3⁺ und IFN γ -produzierender Zellen im ZNS von B7-H1^{-/-} TNF α -DZ Empfänger-mäusen

Um festzustellen, ob an der Protektion gegen EAE durch Injektion von TNF α -DZ auch natürlich vorkommende Tregs beteiligt waren, wurde in der präklinischen Phase die Frequenz FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen analysiert. Zunächst wurde zu diesem Zeitpunkt die Gesamtinfiltration des ZNS mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den drei Gruppen untersucht. Hier konnten an Tag 10 nach EAE Induktion keine Unterschiede in den Populationsgrößen für CD4⁺ T-Zellen (5,1% in PBS vs. 5,6% in DZ[wt] vs. 4,1% in DZ[B7-H1^{-/-}]) und CD8⁺ T-Zellen (1,6% in PBS vs. 1,5% in DZ[wt] vs. 1,6% in DZ[B7-H1^{-/-}]) innerhalb aller lebenden Lymphozyten im ZNS festgestellt werden (Abb. 3.16 A oben). Eine differenziertere Untersuchung der CD4⁺ T-Zell Subpopulationen ergab jedoch, dass der Anteil an FoxP3⁺ Treg in der PBS-Kontrollgruppe mit etwa 18% doppelt so hoch wie bei den TNF α -DZ[wt]-injizierten Mäusen war (hier 9%, Abb. 3.16 A unten). Davon etwa nochmals um etwa 50% reduziert war die Frequenz FoxP3⁺ Treg in TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten Mäusen, deren absoluter Anteil nur bei etwa

5% der CD4⁺ T-Zellen im ZNS lag. In der Peripherie dagegen konnten keine signifikanten Unterschiede für die Frequenz FoxP3⁺ Treg innerhalb der untersuchten Gruppen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

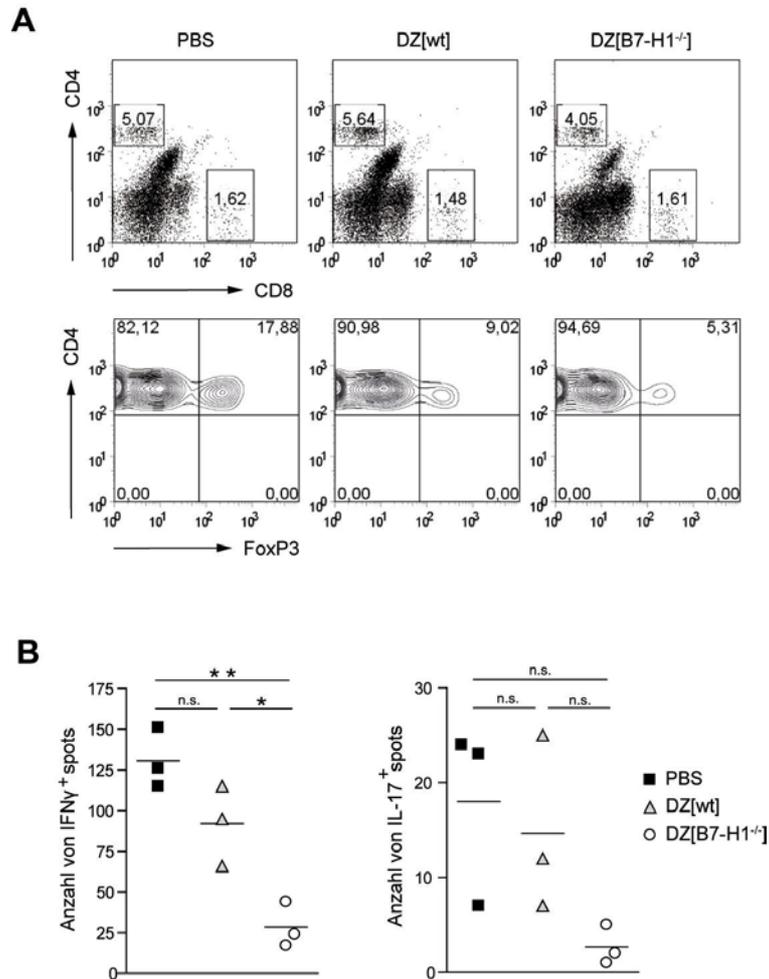


Abb. 3.16: Charakterisierung der ZNS T-Zell-Infiltration und der MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Immunantwort in TNF α -DZ injizierten Mäusen. (A) Wt Empfänger-mäusen mit injiziertem PBS, TNF α -DZ[wt] bzw. TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] wurden an Tag 10 nach EAE Induktion Rückenmark und Gehirn entnommen, die Lymphozyten daraus isoliert und durchflusszytometrisch auf Infiltration mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht. Im oberen Punktdiagramm dargestellt werden exklusiv lebende Lymphozyten, die Zahlenwerte repräsentieren den Prozentsatz CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen der ZNS infiltrierenden Lymphozyten. Im unteren Diagramm wurden die CD4⁺ T-Zellen zusätzlich auf Expression von FoxP3 untersucht. Die Zahlenwerte im 2. Quadranten repräsentieren die Anzahl CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen (n=3 pro Gruppe, dargestellt ist die Analyse einer repräsentativen Maus). (B) Wt Empfänger-mäusen mit injiziertem PBS, TNF α -DZ[wt] bzw. TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] wurden an Tag 15 nach EAE Induktion Rückenmark und Gehirn entnommen, die Lymphozyten daraus isoliert und mit 10 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ für 24 h restimuliert. Die Frequenz Neuroantigen-spezifischer, IFN γ - bzw. IL-17-produzierender Zellen wurde mittels ELISPOT bestimmt. Auf der y-Achse dargestellt ist die Anzahl positiver Zellen pro 5x10⁴ ausplattierter ZNS Zellen. Dargestellt ist eines von zwei repräsentativen Experimenten (n=4), die Symbole in der Grafik repräsentieren die Einzelwerte der Dreifachbestimmungen. * p < 0,05, ** p < 0,01 im Vergleich zur jeweiligen Gruppe, n.s., nicht signifikant

Daraus folgte, dass FoxP3⁺ Tregs keine Rolle für die Protektion gegen EAE spielen, da sie nach TNF α -DZ Injektion eher vermindert im ZNS vorhanden waren, wobei dieser Effekt in Abwesenheit von B7-H1 auf TNF α -DZ noch ausgeprägter war als bei TNF α -DZ[wt].

Außerdem sollte die Anzahl Neuroantigen-spezifischer, IFN γ - und IL-17-sezernierender T-Zellen im ZNS nach TNF α -DZ Injektion am Krankheitsmaximum bestimmt werden. Dazu wurden ELISPOT Analysen mit aus dem ZNS isolierten Lymphozyten aus PBS, TNF α -DZ[wt] und TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] injizierten Mäusen durchgeführt. Wie Abb. 3.16 B zeigt, war die Anzahl MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen nach TNF α -DZ[wt]-Injektion im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe zwar tendenziell, jedoch statistisch nicht signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu konnte nach TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-Injektion eine deutliche Reduktion der IFN γ -positiven Zellen beobachtet werden. Für IL-17 dagegen konnte aufgrund der hohen intraexperimentellen Varianzen keine signifikant verminderte Anzahl MOG₃₅₋₅₅-reaktiver T-Zellen nach TNF α -DZ Injektion festgestellt werden, jedoch ließ sich auch hier ein Trend zu reduzierter Anzahl MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen insbesondere nach TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-Injektion ableiten.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass nach TNF α -DZ Injektion die ZNS-Gesamtinfiltration mit T-Zellen in den Empfängermäusen ähnlich, deren Phänotyp und Reaktivität jedoch qualitativ verändert ist: während sich der Anteil FoxP3⁺ Treg nach TNF α -DZ Injektion um jeweils 50% nach TNF α -DZ[wt]- bzw. 75% nach TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-Injektion reduziert, nimmt auch die Anzahl MOG₃₅₋₅₅-spezifischer, IFN γ -produzierender T-Zellen ab. Aus diesen Daten ergab sich eine direkte Korrelation zwischen der Reaktivität ZNS-infiltrierter, MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen und dem klinischen Schweregrad der EAE bzw. dem Grad der Protektion gegen EAE in PBS bzw. TNF α -DZ injizierten Tieren.

3.5.5 Verstärkte Induktion peripherer CD1d-restringierter T-Zellen durch B7-H1 defiziente TNF α -DZ

Da die vorhergehende Charakterisierung der peripheren Immunantwort auf eine verstärkte Induktion insbesondere IL-10 und IL-13 sezernierender Zellen hinwies, CD1d-restringierte T-Zellen und invariante NKT (iNKT)-Zellen rasch nach ihrer Aktivierung große Mengen an Zytokinen produzieren können und die Rolle von iNKT-Zellen für die protektive Wirkung von TNF α -DZ aus der Literatur bekannt war, sollte untersucht werden, inwieweit deren Funktionalität durch Abwesenheit von B7-H1 auf TNF α -DZ in diesem Modell moduliert wurde (Wiethé et al., 2007). Dazu wurden vergleichend TNF α -DZ[wt] und TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] in wt, CD1d^{-/-} sowie J α 281^{-/-} Empfängermäuse injiziert und das Zytokinprofil im Serum zwei

Stunden nach der letzten TNF α -DZ-Injektion ermittelt. Im Gegensatz zur PBS-Kontrollgruppe war für IL-4 und IL-13 ein deutlicher Anstieg der Zytokinkonzentrationen im Serum von TNF α -DZ-injizierten wt Empfänger-mäusen zu beobachten (Abb. 3.17 A). Gleiches gilt für IFN γ , wenn auch die Unterschiede zur PBS-Gruppe aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht statistisch signifikant waren. Dagegen war die Konzentration an IL-17 im Serum injizierter Mäuse unverändert.

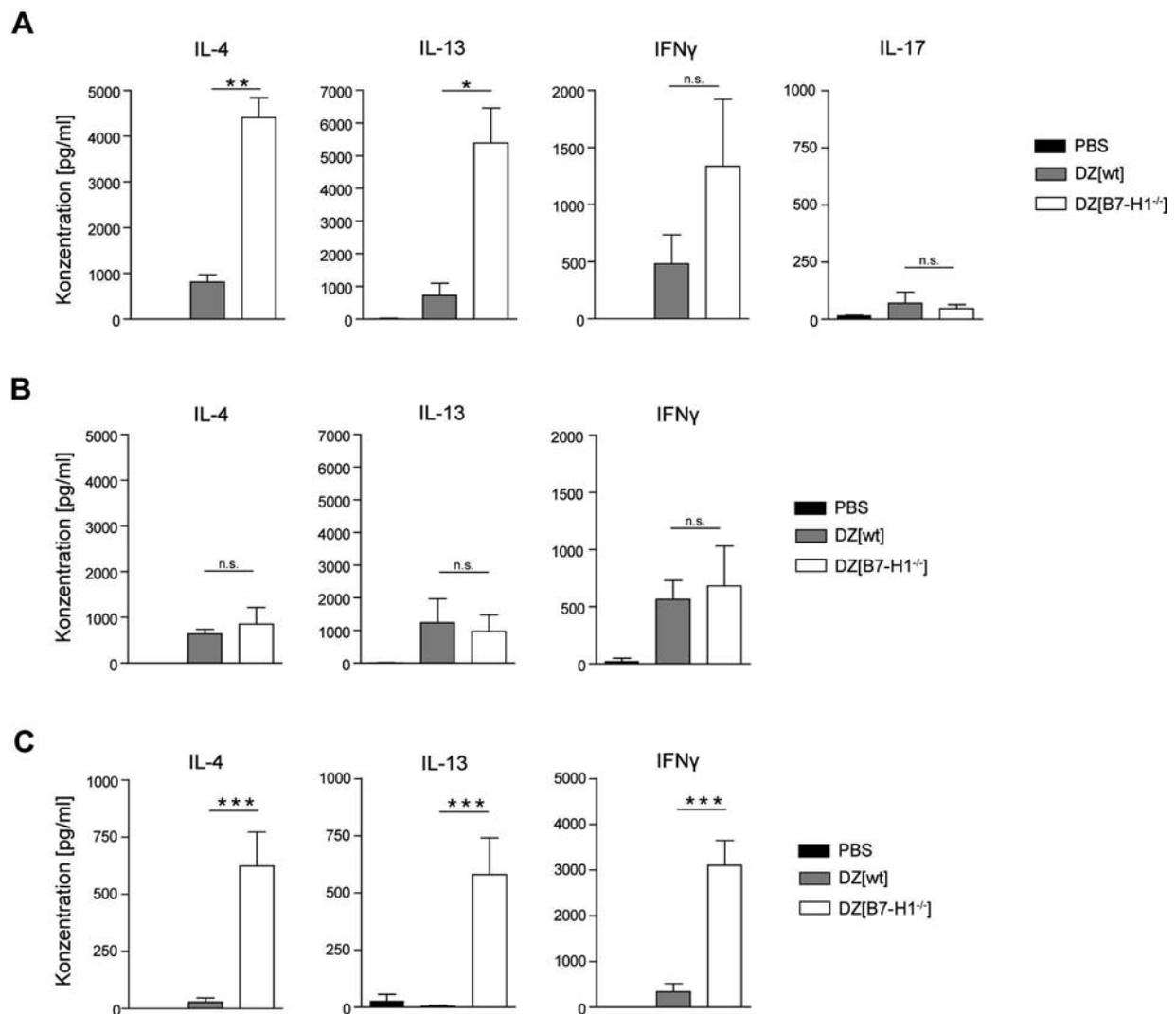


Abb. 3.17: Analyse der Zytokinprofile im Serum von TNF α -DZ-injizierten Mäusen. 2 h nach der letzten DZ-Injektion wurde den Empfänger-mäusen Blut abgenommen, das Serum gewonnen und im ELISA die Konzentrationen von IL-4, IL-13, IL-17 und IFN γ quantifiziert. (A) Zytokinkonzentrationen aus mit PBS, TNF α -DZ[wt] und TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten wt Empfänger-mäusen. (B) Zytokinkonzentrationen aus mit PBS, TNF α -DZ[wt] und TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten CD1d^{-/-} Empfänger-mäusen. (C) Zytokinkonzentrationen aus mit PBS, TNF α -DZ[wt] und TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten Ja281^{-/-} Mäusen. Dargestellt ist eines von zwei repräsentativen Experimenten mit n=3-4 Mäusen. n.s., nicht signifikant, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 im Vergleich zur jeweiligen Gruppe

Diese Daten deuteten somit auf die TNF α -DZ bedingte Induktion eines EAE-protektiven Th2-Milieus hin, welches bereits sehr rasch nach TNF α -DZ-Injektion im Serum der Tiere nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise trug die Abwesenheit von B7-H1 auf den injizierten TNF α -DZ zur erheblichen Steigerung dieses Effekts bei, so dass in TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten Mäusen zusätzlich mehr IL-4 und IL-13 im Serum detektierbar war.

Um den genauen Zelltyp der für die Protektion essentiellen Zytokine IL-4 und IL-13 zu charakterisieren und die Rolle von B7-H1 auf deren Induktion zu erschließen, wurden zusätzlich CD1d^{-/-} Empfängermäuse mit TNF α -DZ injiziert. Diesen Mäusen fehlen aufgrund ihres genetischen Defekts sowohl die Populationen für iNKT-Zellen, als auch CD1d-restringierte T-Zellen (Mendiratta et al., 1997). Es zeigte sich, dass nach TNF α -DZ[wt]-Injektion in CD1d^{-/-} Mäusen annähernd identische Serumlevel für alle untersuchten Zytokine wie in wt Empfängermäusen erreicht wurden (Abb. 3.17 B). Folglich wurde durch TNF α -DZ[wt] Injektion ein basales, Th1-/Th2-ähnliches Zytokinmilieu induziert, welches hauptsächlich von „klassischen“ T-Zellen erzeugt wird. Besonders deutlich jedoch konnte der B7-H1-vermittelte Effekt auf TNF α -DZ in Abwesenheit von iNKT-Zellen und CD1d-restringierten T-Zellen gezeigt werden: Bei Injektion von TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] in CD1d^{-/-} Mäuse konnte nun keine signifikante Erhöhung der IL-4 und IL-13 Konzentration im Serum der Tiere festgestellt werden, was auf eine Beteiligung von spezifisch durch TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-aktivierte iNKT-Zellen und/oder CD1d-restringierten T-Zellen als Quelle für die über das normale Maß hinausgehende Zytokinkonzentration von IL-4 und IL-13 hinweist. Um weitergehend die Implikation dieser beiden Zellpopulationen zu differenzieren, wurde die spezifische Rolle von iNKT-Zellen mit Hilfe von J α 281^{-/-} Empfängermäusen untersucht, welche aufgrund ihres genetischen Defekt keine V α 14-J α 18 NKT (iNKT)-Zellen besitzen. Hier zeigte sich ähnlich zur Situation in wt Empfängermäusen eine signifikant erhöhte Konzentration von IFN γ , IL-4 und IL-13 im Serum TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierter Mäuse im Vergleich zur TNF α -DZ[wt]-Gruppe (Abb. 3.17 C).

Zusammenfassend resultiert aus diesen Daten, dass B7-H1 auf TNF α -DZ ein inhibitorisches Signal an die an der Protektion gegen EAE beteiligten IL-10-produzierenden Tr1-Zellen und IL-4/IL-13-produzierenden CD1d-restringierten T-Zellen vermittelt, wohingegen iNKT-Zellen weniger durch B7-H1 Interaktionen beeinflusst werden können. Durch Abwesenheit von B7-H1 auf TNF α -DZ können Tr1- und CD1d-restringierte T-Zellen folglich effektiver aktiviert werden und das periphere Zytokinmilieu hin zu Th2 modulieren. Dies führt zu einer besseren Protektion gegen EAE durch Inhibition autoreaktiver Th1-/Th17-Zellen.

Mäuse mit i.z. LPS-DZ[wt] zeigten bereits ab Tag 8 nach EAE Induktion erste klinische Symptome und damit einen etwas früheren Beginn und schnelleren Anstieg der Erkrankung, wengleich der Unterschied zu den Mäusen der i.z. PBS-Gruppe, welche ab Tag 12 nach EAE Induktion erkrankten, nicht signifikant war (Abb. 3.18 B,C). Interessanterweise führte Abwesenheit von B7-H1 auf LPS-DZ zu einer leichten Verzögerung des Erkrankungsbeginns im Vergleich zu LPS-DZ[wt] (Tag 10 vs. Tag 8 nach EAE Induktion), was jedoch ebenfalls statistisch nicht signifikant war. Die i.z. TNF α -DZ[wt]- und PBS-behandelten Mäuse ähnelten sich dagegen bezüglich dem zeitlichen Startpunkt der EAE (erste klinische Symptome ab Tag 12). Im Gegensatz dazu hatten i.z. TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] einen deutlich protektiven Effekt auf den gesamten EAE-Verlauf, indem die entsprechenden Empfängermaüse erheblich später (Tag 15 nach EAE Induktion) und weniger stark erkrankten als alle anderen untersuchten Gruppen.

3.6.2 Abschwächung der frühen T-Zell-Akkumulation im ZNS intra-zerebral DZ-injizierter Mäuse durch TNF α -behandelte DZ

Wie aus Abb. 3.12 hervorging, führten i.z. applizierte und MOG₃₅₋₅₅ beladene DZ zur Akkumulation Antigen-spezifischer T-Zellen im ZNS, was in einem rascher beginnenden EAE-Verlauf resultierte. Als nächstes sollte deshalb untersucht werden, ob und inwieweit die ZNS-lokalisierte T-Zell-Akkumulation nach i.z. Injektion von verschiedenen DZ mit dem klinischen Verlauf der EAE korrelierte. Durchflusszytometrische Analysen des ZNS in der präklinischen Phase wiesen auf eine massiv vergrößerte Population von CD4⁺ T-Zellen im ZNS aller mit DZ-injizierten Mäuse hin, die zwischen 9% und 20% der Gesamtlymphozytenpopulation im ZNS betrug (Abb. 3.19 A). Auffallend war in diesem Zusammenhang die erhöhte Infiltration mit CD4⁺ T-Zellen nach DZ[B7-H1^{-/-}]-Injektion, die unabhängig vom Maturierungsstimulus der applizierten DZ mit 17,6% (nach LPS-Stimulation) und 20,2% (nach TNF α -Stimulation) stets über der durch DZ[wt]-Injektion hervorgerufenen T-Zell-Akkumulation lag (LPS: 13,6%, TNF α : 9%). I.z. PBS-Injektion dagegen resultierte in einer moderaten T-Zell-Akkumulation von 2,5% CD4⁺ und 0,6% CD8⁺ T-Zellen im ZNS. Der Anteil CD8⁺ T-Zellen im ZNS stieg ebenfalls in allen untersuchten Gruppen nach DZ-Injektion an, wengleich der Effekt hier schwächer ausgeprägt war: die Anwesenheit von DZ[wt] im ZNS erzeugte einen Anstieg der CD8⁺ T-Zellpopulation auf 1,3% bzw. 0,8 % (nach LPS bzw. TNF α Stimulation), während sich die Frequenz nach DZ[B7-H1^{-/-}] um Faktor 3-5 erhöhte (nach TNF α bzw. LPS Stimulation). Da außer der Populationsgröße im ZNS auch die tatsächliche Anzahl dieser Zellen im Zielorgan Relevanz für den EAE-Verlauf besitzt,

wurden zusätzlich die korrespondierenden Werte für $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen ermittelt. Hier zeigte sich erneut eine deutliche Zunahme der $CD4^+$ T-Zellen, bedingt durch die i.z. DZ-Injektion (Abb. 3.19 C). Bemerkenswert war zudem, dass LPS-stimulierte DZ zu einer enormen Steigerung der Anzahl $CD4^+$ sowie $CD8^+$ T-Zellen im ZNS führten, während letztere in den anderen Gruppen unverändert blieben.

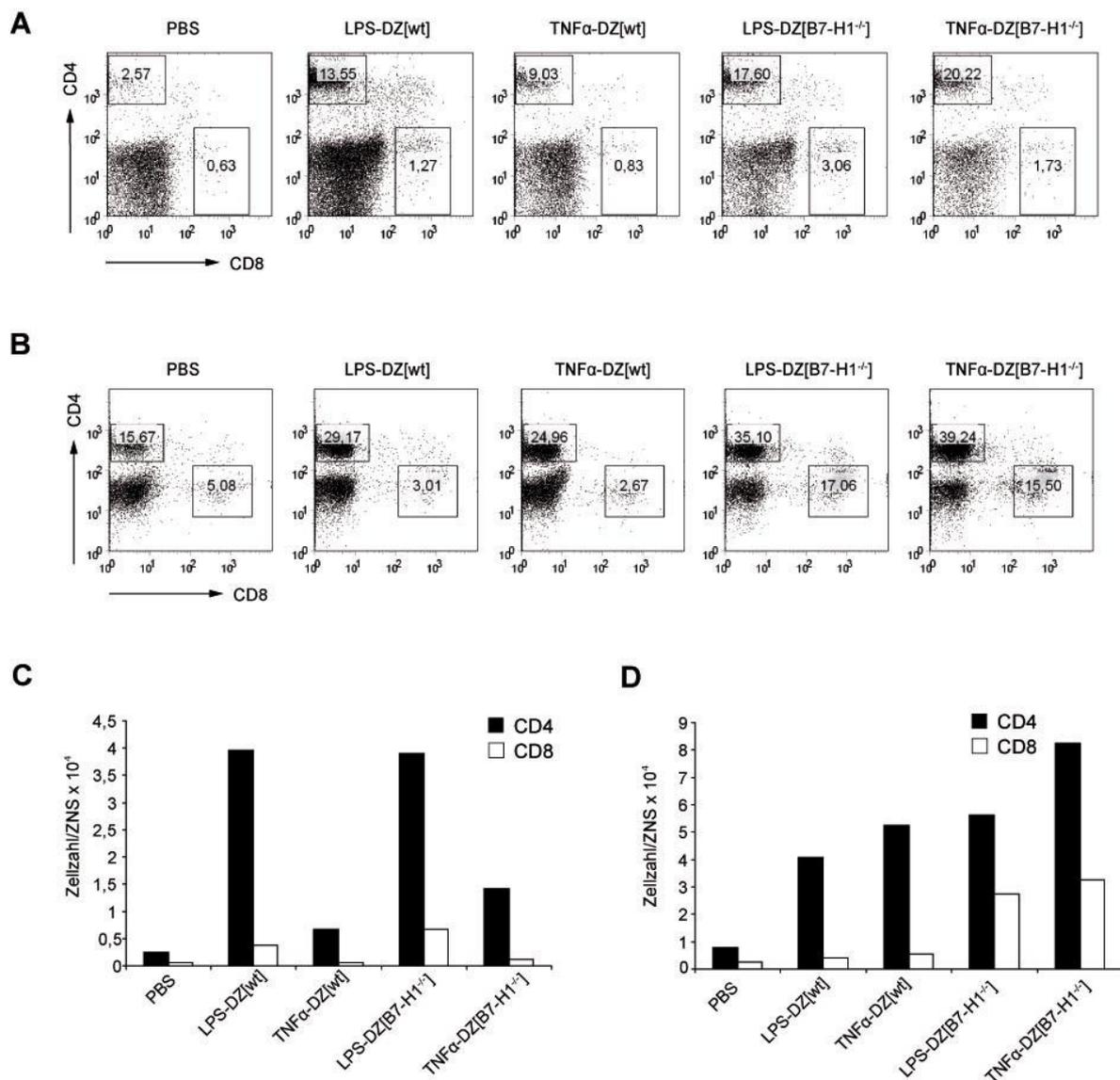


Abb. 3.19: Charakterisierung der ZNS-Immuneinfiltration in PBS bzw. DZ-injizierten wt Empfängermäusen in der präklinischen bzw. klinischen Phase nach MOG₃₅₋₅₅ Immunisierung. Wt Empfängermäusen mit i.z. Applikation von PBS oder $2,5 \times 10^5$ DZ aus wt bzw. B7-H1^{-/-} Mäusen, die mit LPS oder TNFα *in vitro* maturiert und mit MOG₃₅₋₅₅ beladen wurden, wurde an Tag 7 (A, C) bzw. Tag 19 (B, D) ZNS Material entnommen, die Lymphozyten daraus isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. (A,B) In den Punktdiagrammen dargestellt werden exklusiv lebende Lymphozyten, die Zahlenwerte repräsentieren den Prozentsatz $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen der ZNS infiltrierenden Lymphozyten aus einer repräsentativen Maus (insgesamt je Zeitpunkt n=3). (C,D) Die absolute Zellzahl $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen pro ZNS einer untersuchten Maus wurde anhand der jeweiligen Gesamtzellzahl und des spezifischen Anteils positiv für $CD4$ und $CD8$ gefärbter Zellen errechnet (Daten zusammengefasst aus je 4 Mäusen pro Gruppe).

Ein ähnliches Bild der Populationsgrößen im ZNS ergab sich bei der Analyse von ZNS Gewebe an Tag 19 nach EAE-Induktion. Wieder resultierte DZ-Injektion in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Akkumulation im ZNS, wobei nun insgesamt größere Immunzellpopulationen zwischen 15,7% (PBS) und 39,2% (TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]) bei allen untersuchten Gruppen detektiert werden konnten (Abb. 3.19 B). Während in der präklinischen Phase TNF α -Behandlung von DZ noch in einer Reduktion der T-Zell Infiltration im ZNS immunisierter Mäuse resultierte, war dieser Effekt zu einem späteren Zeitpunkt aufgehoben und die Populationsgrößen erreichten das Niveau der LPS-behandelten DZ (29,1% vs. 25% in DZ[wt], 35,1% vs. 39,2% in DZ[B7-H1^{-/-}]). Die Abwesenheit von B7-H1 auf i.z. DZ führte auch während der klinischen Phase zu einem deutlichen Anstieg der CD4⁺ Population, noch markanter war dieser Unterschied jedoch bei CD8⁺ T-Zellen (17% bzw. 15,5% vs. 2,7-5,1%). Auch bei der Kalkulation der absoluten Anzahl CD8⁺ T-Zellen im ZNS der i.z. injizierten Empfängermäuse zeigte sich dieser um Faktor 3-6 gesteigerte Effekt (Abb. 3.19 D).

Insgesamt war bei diesen Analysen keine eindeutige Korrelation von T-Zell-Infiltration und EAE-Verlauf feststellbar. Zwar konnte gezeigt werden, dass die am schnellsten und schwersten von der Erkrankung betroffene Gruppe mit LPS-DZ[wt] erhöhte Frequenzen an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im ZNS im Vergleich zur PBS-Kontrolle aufwies, jedoch war dies auch in anderen DZ-injizierten Gruppen der Fall, insbesondere in der teilweise protektierten TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] Gruppe. Aus diesen Daten lässt sich demnach ableiten, dass die i.z. Injektion MOG₃₅₋₅₅ präsentierender DZ eine persistierende T-Zell-Akkumulation im ZNS induziert, die zur Amplifikation der Neuroinflammation während der frühen Phase der EAE beitragen kann. Umgekehrt kann Präinkubation der DZ mit TNF α oder Verlust von B7-H1 auf der DZ-Oberfläche zu einer Abschwächung der EAE-Pathologie führen, was nicht in direkter Korrelation mit der T-Zell-Infiltration im ZNS steht.

3.6.3 Verstärkte Produktion von IL-10 und reduzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach Injektion TNF α -behandelter und/oder B7-H1^{-/-} DZ

Um herauszufinden, welche Faktoren für einen verfrühten oder verzögerten Beginn der Erkrankung bei i.z. DZ-injizierten Mäusen verantwortlich sind, wurden die Zytokinmuster MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen in der Peripherie sowie im ZNS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der EAE untersucht.

Generell hatte die i.z. Applikation von DZ gegenüber PBS eine verstärkte Produktion von allen analysierten Zytokinen zur Folge, die jedoch je nach DZ-Typ und DZ-Maturations-

stimulus unterschiedlich zusammengesetzt war. Insbesondere an Tag 7 nach EAE Induktion konnten in i.z. DZ-injizierten Mäusen sowohl in der Peripherie als auch im ZNS große Mengen an proinflammatorischen (IFN γ , IL-17, GM-CSF) und antiinflammatorischen (IL-10) Zytokinen nachgewiesen werden, während dies in der PBS-Gruppe erst an Tag 17 der Fall war (Abb. 3.20). Zu diesem Zeitpunkt resultierte Injektion von LPS-DZ[wt] in einem massiven Anstieg der IFN γ und IL-17 Konzentration (962 pg/ml bzw. 1236 pg/ml), während die Abwesenheit von B7-H1 auf LPS-DZ eine Reduktion auf 479 pg/ml für IFN γ (etwa 50%) und 184 pg/ml für IL-17 (etwa 85%) im ZNS bewirkte. Gleichzeitig führte LPS-DZ-Injektion unabhängig von B7-H1 Expression auf DZ zu einer erhöhten Sekretion von GM-CSF (353 pg/ml DZ[wt] bzw. 250 pg/ml DZ[B7-H1^{-/-}]), während in TNF α -DZ-injizierten Mäusen kaum GM-CSF nachgewiesen werden konnte (30-94 pg/ml). Bemerkenswerterweise schränkten TNF α -DZ sowohl im peripheren als auch im ZNS Kompartiment IL-17-produzierende MOG₃₅₋₅₅-spezifische T-Zellen im Vergleich zu LPS-DZ ein (26/21 pg/ml vs. 1235/184 pg/ml im ZNS, 263/804 pg/ml vs. 10910/1462 pg/ml Milz). Zusätzlich erhöhte die Abwesenheit von B7-H1 auf TNF α -DZ die Produktion von IL-10 im ZNS im Vergleich zu den anderen DZ-injizierten Gruppen um durchschnittlich etwa 50% (383/ 335/ 219 pg/ml vs. 639 pg/ml). Dieser Effekt für IL-10 bei TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] wurde auch in der Peripherie deutlich (8244 pg/ml vs. 443-4751 pg/ml).

Während der klinischen Phase an Tag 19 nach EAE Induktion enthielten LPS-DZ[wt] injizierte Mäuse MOG₃₅₋₅₅-spezifische T-Zellen mit einem klaren Th17-polarisierten Phänotyp in der Milz (7841 pg/ml) sowie im ZNS (1350 pg/ml), was etwa doppelt so viel wie in PBS und TNF α -DZ[wt] und zehnmals so viel wie in DZ[B7-H1^{-/-}] beträgt. Zu diesem Zeitpunkt enthielten TNF α -DZ Mäuse jedoch den Großteil IFN γ -produzierender Zellen im ZNS im Vergleich zu LPS-DZ (2468 pg/ml vs. 962 pg/ml), was auf einen Th1-Phänotyp in diesen Gruppen hinweist. Dieser war jedoch bei Abwesenheit von B7-H1 auf DZ im Vergleich zu DZ[wt] abgeschwächt (1817 pg/ml vs. 636 pg/ml). Wie schon an Tag 7 nach EAE Induktion führte TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}] zu einem erhöhten Level an IL-10 in der Peripherie im Vergleich zu allen anderen Gruppen (2437 pg/ml vs. 42-1107 pg/ml).

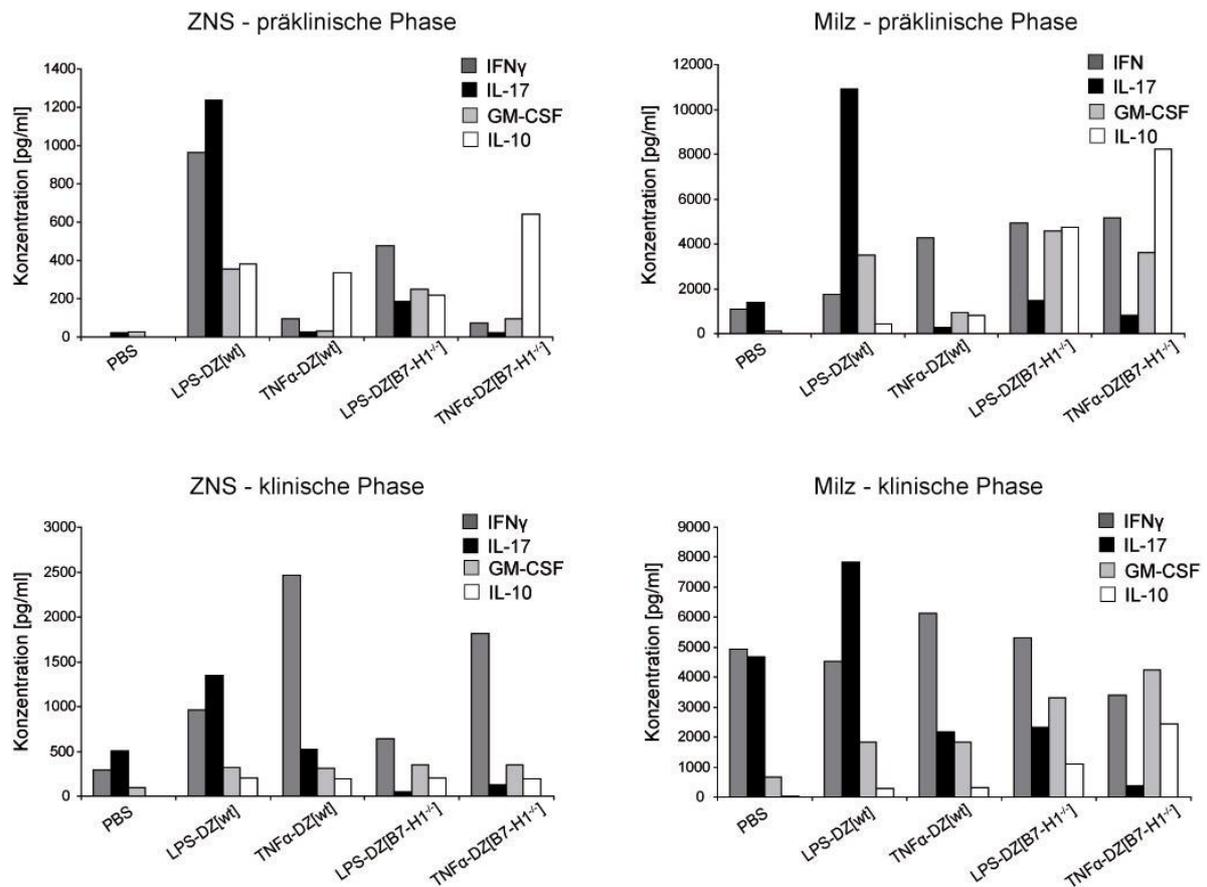


Abb. 3.20: Charakterisierung der MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Immunantwort von i.z. PBS bzw. DZ-injizierten Empfängermäusen in der präklinischen und klinischen Phase der EAE. An Tag 7 nach EAE Induktion aus Hirn und Rückenmark isolierte ZNS-Lymphozyten (links oben) bzw. Splenozyten (rechts oben) wurden mit 10 µg/ml MOG₃₅₋₅₅ für 24 h restimuliert. An Tag 19 nach EAE Induktion aus Hirn und Rückenmark isolierte ZNS-Lymphozyten (links unten) bzw. Splenozyten (rechts unten) wurden mit 10 µg/ml MOG₃₅₋₅₅ für 24 h restimuliert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der IFN γ , IL-17, IL-10 und GM-CSF Konzentration im Zellkulturüberstand mittels CBA. Dargestellt sind Werte aus einem von zwei repräsentativen Experimenten mit n=3-4 Mäusen pro untersuchter Gruppe.

Diese Daten deuten darauf hin, dass LPS-stimulierte i.z. DZ in Empfängermäusen zur Polarisation persistierender Th1-/Th17-Immuneantworten führt, welche zur akuten EAE-Pathogenese beitragen und durch Abwesenheit von B7-H1 auf DZ besonders im Fall von Th17-Zellen abgemildert werden. Im Gegensatz dazu induzieren i.z. TNF α -DZ hauptsächlich IL-10-produzierende Zellen im ZNS, welche zur transienten Einschränkung der Th1- und dauerhaften Einschränkung der Th17-vermittelten Pathologie der EAE beitragen. Auch hier resultiert B7-H1 Defizienz in einer Verstärkung des protektiven Effekts durch Erhöhung der i.z. und peripheren Frequenz IL-10-produzierender, MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen.

3.6.4 Suppression MOG₃₅₋₅₅-spezifischer CD4⁺ T-Zellen durch *ex vivo* isolierte CD8⁺ T-Zellen aus intrazerebral DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten Mäusen

Bei Betrachtung der ZNS Infiltration i.z. DZ-injizierter wt Empfängermaüse fiel auf, dass besonders im späteren EAE-Verlauf die i.z. Applikation von DZ[B7-H1^{-/-}] zur massiven Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen ins ZNS führte (Abb 3.19 B, D). Da Abwesenheit von B7-H1 auf DZ jedoch zur Attenuierung des klinischen Bildes und Ausprägung eines eher antiinflammatorischen Milieus führte, lag die Vermutung nahe, dass diese CD8⁺ T-Zellen keine potentiell pathogenen Effektorzellen darstellen, sondern möglicherweise regulatorischen Charakter aufweisen. Zudem war unklar, ob die CD8⁺ T-Zellen durch DZ[B7-H1^{-/-}]-Injektion vermehrt von der Peripherie ins ZNS rekrutiert wurden oder ob sie lokal im ZNS proliferierten. Um diese Fragestellungen beantworten zu können, wurden Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten und ZNS i.z. PBS bzw. DZ-injizierter wt Empfängermäusen untersucht, wobei die DZ zuvor aus wt bzw. B7-H1^{-/-} Mäusen isoliert, unter LPS-Stimulation ausgereift und mit MOG₃₅₋₅₅ beladen wurden.

Zunächst erfolgte die Bestimmung des Phänotyps der im ZNS und der Milz befindlichen CD8⁺ T-Zellen 14 Tage nach EAE-Induktion. CD122 wurde kürzlich als Marker für natürlich vorkommende CD8⁺ regulatorische T-Zellen beschrieben (Endharti et al., 2005; Rifa'i et al., 2004; Rifa'i et al., 2008). In Übereinstimmung mit der Literatur exprimierten im vorliegenden Versuch etwa 8-12% aller CD8⁺ Splenozyten CD122 (Abb. 3.21 oben), in den zervikalen Lymphknoten war deren Anteil nach DZ[B7-H1^{-/-}]-Injektion mit etwa 13% gegenüber den anderen beiden Gruppen erhöht (Abb. 3.21 Mitte). Im Gegensatz dazu konnten im ZNS etwa 48% CD8⁺CD122⁺ in der PBS-Kontrollgruppe detektiert werden (Abb 3.21 unten). Nach DZ-Injektion verdoppelte sich dieser Anteil nochmals, so dass mit etwa 95% (DZ[wt]) bzw. 88% (DZ[B7-H1^{-/-}]) nahezu alle im ZNS vorkommenden CD8⁺ T-Zellen einen regulatorischen Phänotyp aufwiesen. Anhand der BrdU-Inkorporation zeigte sich, dass nach DZ[B7-H1^{-/-}]-Injektion CD8⁺ CD122⁺ T-Zellen in allen drei untersuchten Kompartimenten im Vergleich zur PBS- bzw. DZ[wt]-Gruppe am stärksten proliferierten. Besonders deutlich wurde dieser Effekt im ZNS von DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten Tieren, wo 9,6% aller im ZNS lokalisierten CD8⁺ T-Zellen CD122⁺BrdU⁺ waren, während in den anderen beiden Gruppen kaum BrdU⁺ Treg zu finden waren.

Aus diesen Daten ließ sich ableiten, dass die Expansion CD8⁺CD122⁺ regulatorischer T-Zellen bereits peripher in der Milz und den Lymphknoten induziert wurde und dass diese Zellen nach i.z. DZ-Injektion speziell ins ZNS rekrutiert wurden und dort akkumulieren.

Während der EAE jedoch konnten im Zielorgan nur $CD8^+$ Treg nach Injektion von DZ[B7-H1^{-/-}] weiter proliferieren, während unter DZ[wt] keine lokale Proliferation messbar war.

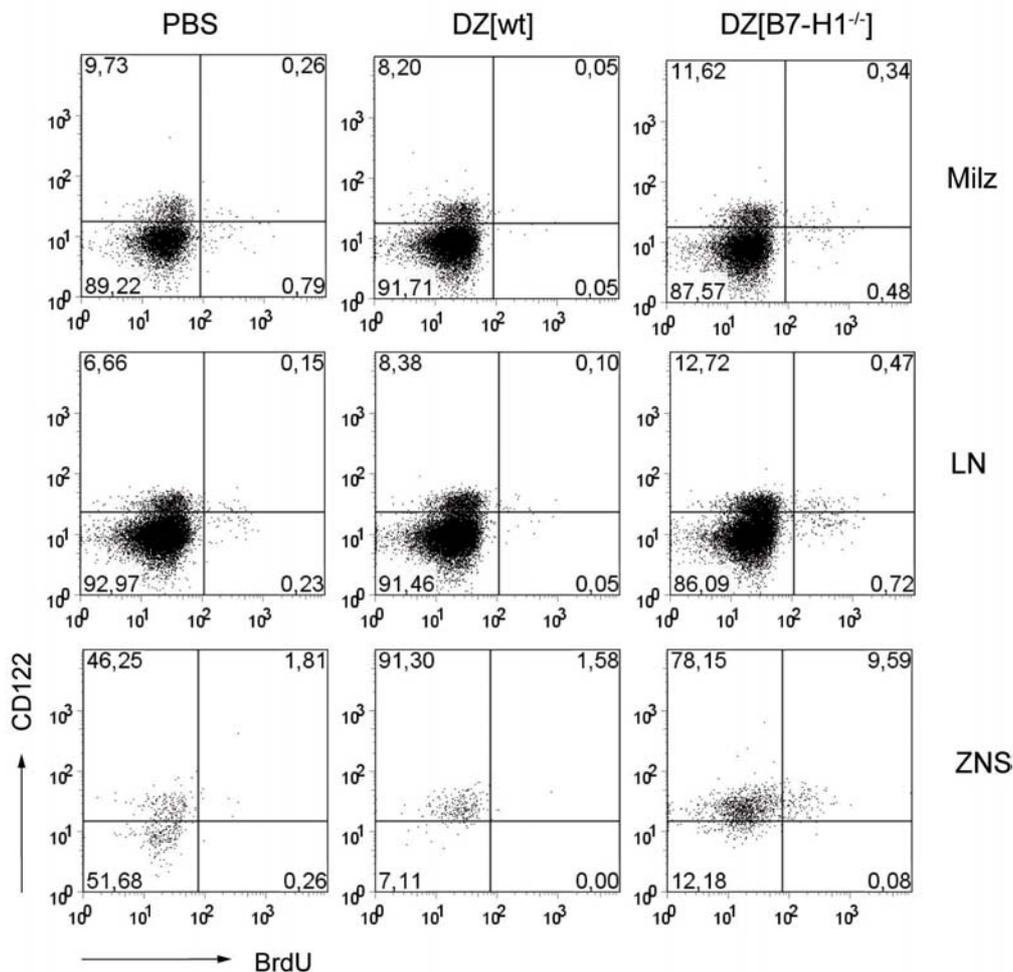


Abb. 3.21: *In vivo* Proliferation von aus der Milz, den zervikalen Lymphknoten (LN) bzw. dem ZNS isolierten $CD8^+$ T-Zellen aus i.z. PBS, LPS-DZ[wt] oder LPS-DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten wt Empfängermausen an Tag 14 nach EAE-Induktion. Als phänotypischer Marker für regulatorische $CD8^+$ T-Zellen wurde CD122 verwendet, die *in vivo* Proliferation wurde durch Detektion von BrdU verfolgt. Die Punktdiagramme zeigen exklusiv lebende $CD8^+$ T-Zellen, die Zahlenwerte repräsentieren den Prozentsatz der jeweils positiven Zellen der vier Quadranten. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments aus zwei Versuchsreihen.

Um zusätzlich die Funktionalität regulatorischer $CD8^+$ T-Zellen zu untersuchen, wurden $CD8^+$ T-Zellen an Tag 20 nach EAE-Induktion aus Milz und ZNS i.z. PBS bzw. DZ-injizierter wt Empfängermausen isoliert. Anschließend wurden *ex vivo* isolierte $CD8^+$ T-Zellen mit MOG₃₅₋₅₅-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen *in vitro* unter Anwesenheit von wt DZ als APZ kokultiviert und 3 Tage später die Proliferation Antigen-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen gemessen. Es zeigte sich, dass aus der Milz isolierte $CD8^+$ T-Zellen unabhängig von der Versuchsgruppe keine suppressive Wirkung auf die Proliferation MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen hatte (Abb. 3.22 A oben). Im Gegensatz dazu konnten $CD8^+$ T-Zellen aus dem ZNS von i.z.

DZ[B7-H1^{-/-}] Mäusen bei einer CD8:CD4 Ratio von 1:25 die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen partiell unterdrücken. Während CD4⁺ T-Zellen in den anderen beiden untersuchten Gruppen etwa zu 88% proliferierten und nach 3 Tagen lediglich rund 11% der Ausgangspopulation noch vorhanden war, betrug der Anteil ungeteilter CD4⁺ T-Zellen mit DZ[B7-H1^{-/-}] 32% (Abb. 3.22 unten). Durch Erhöhung der CD8:CD4 Ratio im Versuchsansatz konnte der inhibierende Effekt durch CD8⁺ T-Zellen aus DZ[B7-H1^{-/-}] Mäusen noch deutlicher gemacht werden, da bei einem Verhältnis von 1:6 bis zu 88% Suppression der MOG₃₅₋₅₅-spezifischen CD4⁺ T-Zellen stattfand (Abb. 3.22 B).

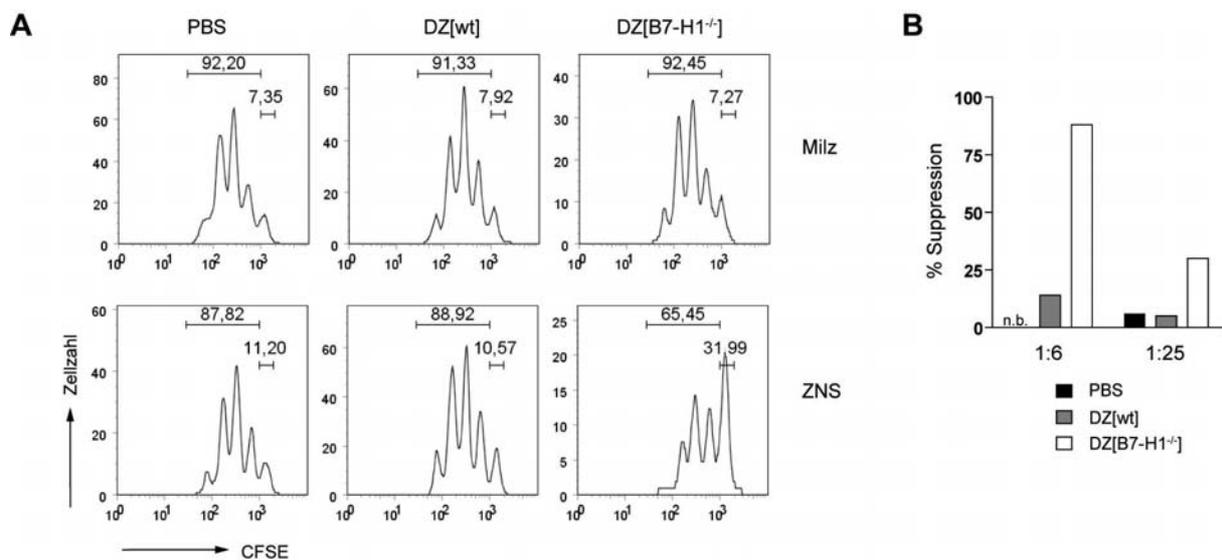


Abb. 3.22: *In vitro* Suppressionsassay mit aus i.z. PBS, LPS-DZ[wt] oder LPS-DZ[B7-H1^{-/-}] injizierten wt Empfängermäusen isolierten CD8⁺ Treg und MOG₃₅₋₅₅ CD4⁺ T-Zellen. (A) MOG₃₅₋₅₅-spezifische CD4⁺ T-Zellen wurden aus 2D2 Mäusen isoliert, mit CFSE angefärbt und 2x10⁴ CD4⁺ T-Zellen zusammen mit 8x10² CD8⁺ T-Zellen aus der Milz bzw. dem ZNS von i.z. PBS, DZ[wt] oder DZ[B7-H1^{-/-}] injizierten Mäusen, sowie mit 5x10³ MOG₃₅₋₅₅ beladenen DZ[wt] kokultiviert. Nach 3 Tagen erfolgte die Analyse der Proliferation anhand der CFSE-Verteilung innerhalb der CFSE⁺ Zellen, wobei die angegebenen Zahlenwerte die Prozentzahl der insgesamt proliferierten Zellen bzw. die Prozentzahl der ersten, ungeteilten Generation darstellen. (B) Grafische Darstellung der Suppression von *ex vivo* aus ZNS Material isolierten CD8⁺ Treg bei einem CD8:CD4 Verhältnis von 1:6 bzw. 1:25. n.b., nicht bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für insgesamt 3 unabhängige Experimente mit n=3-6 Mäusen pro Gruppe.

Damit konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass die Abwesenheit von B7-H1 auf i.z. DZ die gezielte Rekrutierung von funktionell aktiven, regulatorischen CD8⁺ T-Zellen ins ZNS und deren Expansion im Zielorgan bewirkt und somit zur Eindämmung der Neuroinflammation beiträgt.

4 Diskussion

Bei inflammatorischen Prozessen stellt die Aktivierung von T-Zellen einen komplexen Mechanismus dar, der von der Balance kostimulatorischer wie inhibitorischer Signale abhängig ist (Chen, 2004). Aufgrund seiner inhibitorischen Eigenschaften wurde B7-H1 als wichtiger Faktor zur Aufrechterhaltung von peripherer Toleranz und Limitation von parenchymalen Schäden während der Autoimmunität identifiziert (Greenwald et al., 2005; Okazaki and Honjo, 2006). In dieser Arbeit wurde deshalb die Rolle von B7-H1 auf die Modulation der adaptiven Immunantworten während der aktiven EAE näher untersucht und innerhalb des Modellsystems Effekte von gezielter Manipulation des B7-H1/PD-1-Signalwegs zur Therapie charakterisiert.

4.1 Rolle von B7-H1 in der Modulation adaptiver Immunantworten während der EAE

Vorangegangene Studien postulierten bereits, dass der B7-H1/PD-1 Signalweg *in vitro* und *in vivo* ein entscheidender inhibitorischer Parameter bei der T-Zell-Aktivierung ist (Carter et al., 2002; Latchman et al., 2004; Salama et al., 2003; Zhu et al., 2006). Sowohl hämatopoetische als auch parenchymale Zelltypen können B7-H1 exprimieren, während PD-1 vornehmlich auf aktivierten B- und T-Zellen zu finden ist (Chen, 2004). Während der EAE sind beide Moleküle hochreguliert und ihre Expression konnte in Korrelation mit dem Verlauf der Erkrankung gestellt werden (Liang et al., 2003; Magnus et al., 2005; Salama et al., 2003). Die Bedeutung des B7-H1/PD-1-Signalwegs für die Modulation der EAE wurde anhand zahlreicher Studien mit unterschiedlichen Mausstämmen klar: Präklinische Behandlung mit anti-PD-1 Antikörpern exazerbierte MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE in C57BL/6 Mäusen, Neutralisation von B7-H1 erhöhte die Suszeptibilität für EAE in BALB/c Mäusen und genetische Ablation von B7-H1 machte 129Sv Mäuse empfänglich für die Erkrankung und verschlechterte die klinischen Symptome in C57BL/6 Mäusen (Carter et al., 2002; Latchman et al., 2004; Salama et al., 2003). Die Fragestellung nach der Kinetik der peripheren und ZNS-lokalisierten Immunantwort sowie einer detaillierten Analyse der ZNS-Infiltration während der MOG₃₅₋₅₅ induzierten EAE wurde jedoch bis dato nicht adressiert.

In Übereinstimmung mit der Literatur konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass B7-H1^{-/-} Mäuse schneller und stärker klinische Symptome einer EAE entwickeln (Latchman et al., 2004). Bei genauerer Untersuchung der Kinetik der primären Immunantwort zeigte sich, dass Neuroantigen-spezifische, proinflammatorische T-Zellen des Th1-/Th17-Typs unter sys-

temischer Abwesenheit von B7-H1 in der Peripherie verfrüht auftauchten und verstärkt proinflammatorische Signalzytokine sezernierten. Als Quelle der nach MOG₃₅₋₅₅ Stimulation induzierten IL-17 bzw. IFN γ Produktion konnten in erster Linie CD4⁺ T-Zellen identifiziert werden. Zudem konnte eine erhöhte Frequenz IFN γ -produzierender T-Zellen bei B7-H1^{-/-} Mäusen festgestellt werden, was auf eine raschere Aktivierung und Differenzierung von naiven T-Zellen zu Antigen-spezifischen Effektorzellen hinweist. Diese Beobachtungen entsprechen früheren Berichten zur inhibitorischen Rolle von B7-H1 während der primären Immunantwort und unterstreichen die Bedeutung der untersuchten Zytokine für die EAE Pathogenese (Begolka et al., 1998; Park et al., 2005). Interessanterweise kam es in der Milz von B7-H1^{-/-} Mäusen während des späteren EAE-Verlaufs jedoch zu einer rascheren Reduktion Neuroantigen-spezifischer T-Zellen, wie anhand der sezernierten Konzentration von IFN γ und der Frequenz MOG₃₅₋₅₅-spezifischer, IFN γ -produzierender T-Zellen festgestellt werden konnte. Diese Beobachtung deutet möglicherweise auf eine strukturelle Beteiligung von B7-H1 an der Aufrechterhaltung der Funktionalität und/oder der Lebensfähigkeit Antigen-spezifischer T-Zellen in der Zirkulation hin.

Vor kurzem konnten Keir et al. in einem Diabetes-Modell zeigen, dass die parenchymale Expression von B7-H1 im Pankreas einen wesentlichen Beitrag zur Vermittlung von peripherer Toleranz leistet (Keir et al., 2006). Während B7-H1 auf nicht-hämatopoetischen Zellen die Erkrankung verzögern konnte, hatte das Molekül auf nicht-lymphoiden, hämatopoetischen APZ keinen Effekt. Der B7-H1/PD-1-Signalweg ist damit nicht nur in der Initiationsphase der T-Zell-Aktivierung von Bedeutung, sondern hat auch Einfluss auf die nachfolgende Effektorfunktion von T-Zellen und die Zielorganinfiltration. Im Kontext der EAE stellt das ZNS das Zielorgan in der Peripherie aktivierter, enzephalitogener T-Zellen dar. Dieses wurde lange Zeit als „immunprivilegiertes“ Organ bezeichnet (Bailey et al., 2006). Gründe für eine fehlende effektive Immunantwort gegen ZNS-Antigene könnten im anti-inflammatorischen und für Immunzellen proapoptotischen Umfeld im Gehirn, in geringer MHC-Expression ZNS-residenter APZ, dem Vorhandensein der Bluthirnschranke, dem limitierten Vorkommen aus dem ZNS stammender Antigene in den Lymphknoten und der Abwesenheit von DZ liegen. Nachdem dieses Konzept in den letzten Jahren angefochten und widerlegt wurde, war die essentielle Bedeutung der Gewebs-spezifischen Protektion gegen lokale inflammatorische Prozesse im ZNS für die Immunhomöostase offensichtlich (Hickey, 2001; Miller et al., 2007). ZNS-residente APZ wie Mikrogliazellen und Makrophagen, auf denen B7-H1 Expression im Kontext der EAE nachgewiesen und kinetisch untersucht wurde, stellen dabei einen wichtigen Regulationsmechanismus zur Limitation von lokalen Schäden

durch Inflammation dar (Magnus et al., 2005; Salama et al., 2003). Zudem steigt unter inflammatorischen Bedingungen die Expression von B7-H1 im ZNS und damit möglicherweise die Relevanz dieses Moleküls zur Begrenzung lokaler Schäden. Der exazerbierte EAE-Verlauf in B7-H1^{-/-} Mäusen hatte nach durchflusszytometrischer Analyse eine stärkere Infiltration des ZNS mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zur Folge. Allerdings erbrachte die histologische Quantifizierung von das Rückenmark infiltrierenden Immunzellen keine statistisch signifikanten Ergebnisse, was durch die hohe Varianz innerhalb der untersuchten Gruppen erklärt werden kann. Technisch bedingt kann die Immunhistochemie immer nur randomisiert an einigen Rückenmarksschnitten durchgeführt werden, eine Observation des kompletten ZNS ist mit dieser Methode aufwändig und kaum möglich. Tendenziell zeigte sich jedoch auch hier eine erhöhte Akkumulation von CD4⁺, CD8⁺ und CD11b⁺ Immunzellen im ZNS. Für diese Zellen konnte außerdem eine höhere Reaktivität gegen das bekannte Neuroantigen und eine verstärkte IFN γ -Produktion in allen Phasen der EAE gezeigt werden. Interessanterweise war sowohl in der Peripherie, als auch im ZNS der B7-H1-vermittelte inhibitorische Effekt besonders für IFN γ -produzierende Zellen, jedoch weniger stark für IL-17-produzierende Zellen ausgeprägt. Diese Beobachtung stellt ein bereits häufiger beschriebenes Ergebnis zur Blockade von B7-H1 dar und ist möglicherweise durch den Einfluss anderer Immunzellpopulationen erklärbar (Ansari et al., 2003; Barber et al., 2006; Keir et al., 2006; Salama et al., 2003; Schreiner et al., 2008). Während IL-17 exklusiv von T-Zellen produziert wird, können beispielsweise auch NK-Zellen IFN γ sezernieren. Da auch für NK-Zellen Infiltration des ZNS während der EAE und Expression von B7-H1 gezeigt wurde, könnten sie ebenfalls zum Anstieg der Frequenzen IFN γ -positiver Zellen im ELISPOT von Milz- und ZNS-isolierten Lymphozyten nach B7-H1-Blockade beitragen (Huang et al., 2006; Saudemont et al., 2005).

Im ZNS von B7-H1^{-/-} Mäusen konnten Immunzellen bereits ab einem frühen Zeitpunkt persistieren und auf MOG₃₅₋₅₅ verstärkte Immunantworten bilden, während ihr Anteil in der Milz im Verlauf der Erkrankung sank. Diese Diskrepanz konnte laut den vorliegenden Daten nicht mit unterschiedlichen Apoptoseraten im ZNS der untersuchten Gruppen erklärt werden, sondern ist möglicherweise das Resultat verstärkter Expansion von T-Zellen im ZNS B7-H1-defizienter Tiere oder einer unterschiedlichen Verteilung Neuroantigen-spezifischer Immunzellen. Dabei muss erwähnt werden, dass während der EAE die generelle Verteilung von Immunzellsubpopulationen wie naive, Effektor- und Gedächtniszellen in der Milz und im ZNS keine Differenzen innerhalb der untersuchten Gruppen aufwies. Erwartungsgemäß konnten darüber hinaus im Zielorgan nur voll aktivierte T-Zellen bzw. während der

Remissionsphase zusätzlich Gedächtniszellen identifiziert werden. Diese Daten unterstreichen somit die Bedeutung von B7-H1 auf die Modulation enzephalitogener Effektor-T-Zellen im ZNS: Hochregulation von inhibitorischen Molekülen während inflammatorischer Prozesse könnte als Mechanismus der negativen Rückkopplung dienen, wobei die Aktivität von T-Zellen und damit der Gewebeschaden limitiert werden soll. Das Fehlen eines solchen Steermoleküls wie B7-H1 könnte die ausgeprägte Pathogenese während der Autoimmunantwort und das Ausbleiben der Remissionsphase erklären.

Diese Hypothese konnte auch mittels *in vitro* Versuchen mit MOG₃₅₋₅₅-spezifischen T-Zellen und B7-H1-defizienten APZ bestätigt werden. Es zeigte sich, dass in Abwesenheit bzw. unter Blockade von B7-H1 auf unterschiedlichen APZ Neuroantigen-spezifische T-Zellen quantitativ mehr proinflammatorisches IFN γ sezernieren und besser proliferieren konnten. Da bei der EAE Kostimulation durch APZ sowohl bei der initialen Aktivierung naiver T-Zellen in der Peripherie, als auch bei der Reaktivierung von Effektorzellen im ZNS von entscheidender Bedeutung für die Ausprägung der nachfolgenden Autoimmunantwort ist, könnte eine Störung des B7-H1/PD-1-Signalwegs zu einem Wegfall des inhibitorischen Regulationsmechanismus auf mehreren, unterschiedlichen Ebenen der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen führen. Folglich könnten durch erhöhte proinflammatorische Zytokine und Infiltration bzw. Expansion Neuroantigen-spezifischer T-Zellen ZNS Immunantworten amplifiziert und der lokale Gewebeschaden bestehend aus Demyelinisierung und axonaler Schädigung potenziert werden. Interessanterweise war der inhibitorische Effekt von B7-H1 auf APZ nur bei geringen Antigenkonzentrationen, nicht jedoch bei starkem TZR-Stimulus zu beobachten. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass durch B7-H1/PD-1-Interaktion in erster Linie T-Zell Klone mit geringer Antigenavidität inhibiert werden, wie dies für Autoantigene der Fall ist. Normalerweise werden autoreaktive T-Zell Klone mit einer hohen Avidität für Selbstantigene während des thymischen Selektionsprozesses vernichtet, während solche mit geringer bis mittlerer Avidität im Thymus verbleiben und anschließend in die Peripherie freigesetzt werden können (de Visser et al., 2001; Liu et al., 1995). Tolerogene Signalwege über B7-H1 könnten dazu beitragen, eine Aktivierung dieser autoreaktiven T-Zellen unter physiologischen Bedingungen zu verhindern. Im Gegensatz dazu kann in einem inflammatorischen Umfeld oder unter Bedingungen mit hoher Antigenkonzentration wie beispielsweise einer viralen Infektion ein starkes TZR-Signal gegenläufige kostimulatorische Wechselwirkungen aufheben und T-Zell-Aktivierung und Expansion einleiten.

Es bleibt zu klären, inwieweit das weitestgehend im Tiermodell der EAE entwickelte Konzept der inhibitorischen Rolle von B7-H1 auf das humane System und die MS übertragbar ist.

Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass B7-H1 normalerweise nur auf einigen wenigen mikroglialen Zellen im ZNS gesunder Kontrollpersonen exprimiert wird (Ortler et al., 2008). In chronisch-aktiven sowie akuten Plaques von MS-Patienten konnte dagegen massive B7-H1 Expression auf aktivierten Mikroglia und Makrophagen detektiert werden. Eine andere Studie demonstrierte eine verringerte Expression von B7-H1 auf myeloiden DZ im Blut von sekundär progressiven MS-Patienten im Vergleich zu Patienten mit schubförmigem Krankheitsverlauf (Karni et al., 2006). Schließlich konnte gezeigt werden, dass zur MS-Therapie eingesetztes IFN β *in vitro* und *in vivo* zur Hochregulation von B7-H1 auf Monozyten von MS-Patienten führt und so als negativer Modulator der APZ-T-Zell-Interaktionen in der Peripherie wirkt (Schreiner et al., 2004).

Diese Beobachtungen stimmen mit der Hypothese überein, dass die induzierbare B7-H1 Expression im ZNS die T-Zell-Aktivierung attenuiert, den immunpathologischen Gewebeschaden limitiert und zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase beiträgt.

4.2 Funktionalität intrazerebraler APZ während der ZNS Autoimmunität

Die Entwicklung von klinischen Symptomen einer EAE wird im Wesentlichen durch das initiale Priming und die Reaktivierung von autoreaktiven Effektorzellen beeinflusst. Nach systemischer Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ nehmen APZ das Myelinantigen auf, präsentieren es in lymphatischen Organen naiven T-Zellen, welche daraufhin zur Aktivierung und Expansion angeregt werden (Steinman, 1996). Bevor sie ins Parenchym des Zielorgans einwandern und ihre volle Funktionalität entwickeln können, bedarf es neben der Migration über die Bluthirnschranke der lokalen Reaktivierung durch ZNS-assoziierte APZ (Tompkins et al., 2002). Die Charakterisierung solcher APZ und ihrer funktionellen Eigenschaften wurde besonders in den letzten Jahren forciert, was zur Identifizierung von ZNS-assoziierten DZ als Haupteffektorzelltypen bei der Reaktivierung enzephalitogener Zellen an der Bluthirnschranke führte (Becher et al., 2006). Mit Hilfe eines EAE-Modells, das MHC II-Expression exklusiv auf DZ erlaubte, konnten Greter et al. zeigen, dass ausschließlich DZ zur Reaktivierung enzephalitogener, Neuroantigen-spezifischer T-Zellen und damit zur Induktion der Erkrankung ausreichen (Greter et al., 2005). Unter normalen physiologischen Bedingungen sind DZ nur in geringer Anzahl im ZNS vornehmlich in gefäßreichen Regionen wie den Meningen und dem Plexus choroideus vorhanden, während ihre Frequenz nach lokaler Inflammation rapide ansteigt (Serafini et al., 2000). Die an der Akkumulation von DZ beteiligten Mechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt.

Trotz zahlreicher Studien bleibt weiterhin umstritten, welchen Einfluss intrazerebrale DZ auf die T-Zell-Aktivierung und Perpetuierung von EAE ausüben (Greter et al., 2005; Heppner et al., 2005; McMahon et al., 2005; Suter et al., 2003). In Übereinstimmung mit dem Konzept des ZNS als „immunprivilegiertem Organ“ wurde i.z. DZ eine immuninhibitorische und EAE-protective Rolle zugeschrieben (Suter et al., 2003). Andere Arbeiten dagegen postulierten für ZNS-assoziierte DZ eine Schlüsselrolle in der Induktion und Aufrechterhaltung der Neuroinflammation (Dittel et al., 1999; Weir et al., 2002). Darüber hinaus konnte eine direkte Korrelation der Frequenz von systemisch vorhandenen DZ mit der Stärke klinischer EAE-Symptome durch Modulation des Flt3-Signalwegs nachgewiesen werden (Whartenby et al., 2005). Ebenso wurde die Bedeutung von ZNS-assoziierten DZ für die lokale Aktivierung naiver T-Zellen mit anderen Epitopspezifitäten, also die Initiation von Epitop „spreading“ bei der schubförmig-remittierenden Verlaufsform der EAE gezeigt (Bailey et al., 2007; McMahon et al., 2005).

Mittels i.z. APZ Applikation konnte in dieser Studie zunächst die Fragestellung des Beitrags funktionell unterschiedlicher APZ auf die Generierung Neuroantigen-spezifischer T-Zellen und den klinischen Verlauf der EAE bearbeitet werden. Aus den vorangegangenen *in vitro* Experimenten zur Bestimmung der differentiellen Antigenpräsentationskapazität, in denen eine erhöhte Proliferationsrate MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen mit DZ als APZ gezeigt werden konnte, war zu erwarten gewesen, dass DZ als effizienteste der untersuchten APZ-Typen auch auf den klinischen Verlauf der EAE Einfluss haben. Dies bestätigte sich, da i.z. DZ-Empfängermäuse signifikant früher als die Tiere der Vergleichsgruppen mit i.z. B-Zellen bzw. i.z. Makrophagen an EAE erkrankten. In Übereinstimmung dazu konnte bereits an Tag 9 nach EAE-Induktion in der i.z. DZ-Gruppe eine massive Infiltration des ZNS mit CD4⁺ T-Zellen des Th1-Typs und CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden. Somit wurde durch die Erhöhung der APZ-Frequenz im ZNS die Kinetik der T-Zell-Differenzierung zu potenziell pathogenen Effektorzellen und ihre (Re)aktivierung beschleunigt. Die Überlegenheit von DZ über andere i.z. APZ in der Induktion von Immunantworten ist vermutlich durch die größere Verfügbarkeit von MHC II:Peptid-Komplexen auf ihrer Oberfläche bedingt (Schreiner et al., 2008).

Man könnte nun mutmaßen, dass eine Steigerung effizienter und Neuroantigen-beladener i.z. APZ wie DZ *per se* ausreicht um eine Autoimmunantwort auszulösen. In dieser Arbeit wurde jedoch ebenso wie in der Literatur beschrieben die Notwendigkeit einer peripheren Induktion der EAE durch Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ in CFA für die Entstehung der EAE deutlich (Zozulya et al., 2009). Ferner deuten diese sowie andere Studien darauf hin, dass ZNS-

assoziierte DZ pathogenetisch relevante T-Zell-Antworten lokal im ZNS initiieren können (Greter et al., 2005; McMahon et al., 2005). Es wird deshalb postuliert, dass DZ durch ihre essentielle Funktion der lokalen Antigenpräsentation während der Effektorphase die Kinetik der EAE Initiation durch ihre Rekrutierung ins Zielorgan entscheidend mitbestimmen: je schneller sie ins ZNS gelangen, desto eher entsteht die EAE.

Ausgehend von ihrer Injektionsstelle im ZNS können i.z. DZ entlang den Gehirnnerven in die Milz bzw. die zervikalen Lymphknoten migrieren und dort Immunantworten generieren (Karman et al., 2004). Blockierung dieser Migrationskapazität durch *in vitro* Vorbehandlung mit Pertussistoxin resultierte in einem partiell verzögerten EAE-Beginn im Vergleich zu unbehandelten i.z. DZ, was vermuten lässt, dass die durch i.z. DZ-Injektion vermittelten Effekte nicht nur auf die Antigenpräsentation im Zielorgan limitiert sind, sondern auch in der Peripherie bei der initialen T-Zell-Aktivierung eine Rolle spielen (Zozulya et al., 2009).

4.3 Applikation und Modulation von DZ zur Therapie von Autoimmunerkrankungen

Nachdem die generelle Bedeutung von i.z. DZ auf die Kinetik MOG₃₅₋₅₅-spezifischer Immunantworten und die EAE Pathogenese im Vergleich zu anderen APZ bewiesen worden war, sollte anschließend die Bedeutung von B7-H1 auf diesen Zellen näher untersucht werden. Durch Modulation der immunogenen vs. tolerogenen Funktionalität von DZ in Kombination mit der i.z. Technik konnte gezeigt werden, dass TNF α -behandelte anders als LPS-behandelte i.z. DZ zu keiner wesentlichen Verschlechterung, sondern eher zur Besserung der klinischen EAE-Symptome durch ZNS-lokalisierete, vermehrte Produktion von IL-10 und Restriktion der Th17-Population führten, wobei diese Effekte durch Abwesenheit von B7-H1 auf DZ noch deutlich verstärkt wurden. Als mögliche Mechanismen der verstärkten Protektion nach Störung der B7-H1/PD-1-Interaktionen konnten die effizientere Rekrutierung und Expansion CD8⁺CD122⁺ Treg im ZNS und eine ausgeprägte Suppressionskapazität dieser auf MOG₃₅₋₅₅-spezifische CD4⁺ T-Zellen identifiziert werden.

In einem weiteren Ansatz wurde die Frage nach dem Applikationsweg TNF α -behandelter DZ und die Aufrechterhaltung ihrer tolerogenen Funktionen durch Modulation des Wirkorts adressiert. Es zeigte sich, dass die i.v. Gabe TNF α -behandelter DZ Immuntoleranz vermitteln konnte, wobei die dafür induzierten Mechanismen grundlegend divergierten. Periphere Zytokinanalysen ließen unter i.v. Applikation TNF α -behandelter B7-H1^{-/-} DZ auf eine verstärkte Induktion von Th2-/Tr1-Zellpopulationen sowie eine effizientere Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen durch NKT-Zellen schließen. Klinisch äußerte sich dies in

einem verzögerten EAE-Verlauf nach DZ[wt]-Injektion bzw. vollständiger Protektion gegen EAE nach DZ[B7-H1^{-/-}]-Applikation, begleitet von einer Reduktion IFN γ - und IL-17-produzierender T-Zellen im ZNS. Eine Beteiligung von natürlich vorkommenden CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen konnte hier nicht gezeigt werden.

4.3.1 B7-H1 auf tolerogenen versus immunogenen intrazerebralen DZ

Basierend auf Vorarbeiten von Karman et al. und Zozulya et al., in denen die Notwendigkeit der Antigenbeladung und -spezifität von DZ für die ZNS-lokalisierte Akkumulation Antigen-spezifischer T-Zellen und die Induktion einer systemischen Immunantwort nach i.z. DZ-Injektion gezeigt worden waren, wurde die Rolle von B7-H1 auf diesen mit MOG₃₅₋₅₅ beladenen APZ untersucht (Karman et al., 2006; Karman et al., 2004; Zozulya et al., 2009)). Als Kontrollgruppen dienten zum einen PBS-injizierte Mäuse, in denen durch i.z. Injektion ein vergleichbares Mikrotrauma im Gehirn ausgelöst wurde, zum anderen DZ[wt]-injizierte Mäuse um die B7-H1-vermittelten Effekte beobachten zu können.

Maturierung von DZ[wt] mit LPS und anschließende i.z. Applikation in wt-Empfängermäuse resultierte in einer tendenziell schnelleren Entwicklung von klinischen EAE-Symptomen, wengleich der Unterschied zur PBS- bzw. DZ[B7-H1^{-/-}]-Gruppe nicht statistisch signifikant war. Anders als nach i.v. Applikation TNF α -maturierter DZ[wt] bewirkten diese tolerogenen DZ im ZNS keine Protektion der Empfängermäuse, während die Abwesenheit von B7-H1 auf DZ zumindest partiell vor klinischen Symptomen schützen konnte, d.h. den Beginn der Erkrankung verzögern und die Schwere abmildern konnte. Somit lag die Vermutung nahe, dass B7-H1 nicht nur wie für B7-H1^{-/-} Mäuse zuvor gezeigt, potenziell pathogene Effektorzellen inhibieren, sondern auch die Funktionalität regulatorischer bzw. antiinflammatorischer Zelltypen negativ modulieren kann. Die anschließende Analyse der ZNS-Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen deutete auf einen massiven Einstrom von Immunzellen nach i.z. DZ-Injektion im Vergleich zu PBS-injizierten Mäusen ins Hirnparenchym hin, wobei qualitative Unterschiede in den Subpopulationen feststellbar waren. LPS-maturierte DZ[wt] führten zu einer quantitativ ähnlich hohen Infiltration wie bei DZ[B7-H1^{-/-}], die Fähigkeit zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN γ , IL-17 und GM-CSF war jedoch stärker ausgeprägt als in Abwesenheit von B7-H1 auf DZ. Gerade für GM-CSF konnte kürzlich eine EAE-exazerbierende Funktion nachgewiesen werden, da dieses von enzephalitogenen T-Zellen produzierte Zytokin selektiv Mikrogliazellen aktiviert und für die Initiation der ZNS-Inflammation von entscheidender Bedeutung ist (Ponomarev et al., 2007). DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierte Mäuse hatten ein transientes Defizit bezüglich der IFN γ -Produktion während der

frühen EAE-Phase, wohingegen zu späteren Zeitpunkten annähernd gleiche Level dieses Zytokins sezerniert werden konnten. IL-17 dagegen war in allen Phasen der Erkrankung nach MOG₃₅₋₅₅ Stimulation ZNS-lokalisierter T-Zellen nur in geringen Mengen nachweisbar. Die Abwesenheit von B7-H1 auf TNF α -maturierten i.z. DZ hatte eine intensivierete Ausbildung des protektiven Th-Profiles zur Folge: Im ZNS TNF α -DZ-behandelter Mäuse konnten vermehrt MOG₃₅₋₅₅-spezifische IL-10⁺ T-Zellen detektiert werden, die mutmaßlich zur Restriktion von Th1- und Th17-Zellen beitrugen. Auch hier fand die inhibierende Wirkung, diesmal bedingt durch TNF α -Vorbehandlung von DZ, auf IFN γ -produzierende T-Zellen nur vorübergehend und in der frühen EAE-Phase statt, während IL-17-Produzenten dauerhaft restringiert wurden.

Das Ausmaß der ZNS-Infiltration stand also nicht in direkter Korrelation mit dem EAE-Verlauf, die Analyse der differenzierten T-Zell-Subpopulationen ergab jedoch ein reduziertes Th1/Th17-Profil in Abwesenheit von B7-H1 auf i.z. LPS-DZ sowie eine verstärkte Induktion von IL-10⁺ T-Zellen auf i.z. TNF α -DZ. Gemäß dem klassischen Paradigma zur DZ-Maturierung, welches LPS-maturierte DZ als immunogen charakterisiert, in Kombination mit dem Verlust eines inhibitorischen Signals auf DZ, hätte man primär eine verstärkte Immunpathogenese der EAE bei i.z. DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten Mäusen erwarten können (Reis e Sousa, 2006). Da dies nicht der Fall war, sondern die Injektion von LPS-DZ[B7-H1^{-/-}] im Vergleich zur PBS-Gruppe keine wesentlichen Unterschiede ergaben, könnte man eine parallel zur Induktion von enzephalitogenen Effektorzellen stattfindende Aktivierung regulatorischer T-Zell-Subpopulationen postulieren. In Abwesenheit von B7-H1 auf DZ könnte die Aktivierung von Treg ebenfalls gesteigert sein, so dass in diesen Mäusen insgesamt ein Gleichgewicht aus enzephalitogenen und regulatorischen Effekten herrscht.

Tatsächlich war eine unerwartete Beobachtung dieser Experimente die massive Infiltration des ZNS mit CD8⁺ T-Zellen nach Injektion B7-H1-defizienter DZ. Da sowohl die klinischen Daten als auch die Zytokinanalysen gegen einen pathogenen Effektorzellphänotyp dieser CD8⁺ T-Zell Population sprachen und eher auf einen regulatorischen Charakter hindeuteten, erfolgten im Anschluss detaillierte Untersuchungen dieser Zellen. Es zeigte sich, dass der Hauptanteil ZNS-lokalisierter CD8⁺ T-Zellen nach DZ-Injektion zusätzlich CD122 auf der Oberfläche exprimierte, einen Marker der kürzlich mit natürlichen CD8⁺ Treg assoziiert wurde (Endharti et al., 2005; Rifa'i et al., 2004; Rifa'i et al., 2008). Systemische BrdU-Gabe in i.z. DZ-injizierten Mäusen und anschließende Untersuchungen verschiedener, an der DZ-T-Zellinteraktion beteiligten Immunkompartimente ließen auf eine geringe periphere Proliferation von CD122⁺CD8⁺ T-Zellen in allen untersuchten Gruppen schließen. Im Gegensatz dazu

fand exklusiv im ZNS DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierter Mäuse eine starke Proliferation von CD8⁺ Treg statt. Die erhöhte Frequenz an APZ in EAE-induzierten Mäusen in Kombination mit der aus der Literatur bekannten gesteigerten Sensitivität von CD8⁺ T-Zellen gegenüber B7-H1-vermittelter Kostimulation macht eine lokal im ZNS stärker ausgeprägte Proliferation unter Anwesenheit von DZ[B7-H1^{-/-}] erklärbar (Latchman et al., 2004). Demnach können durch den Wegfall inhibitorischer Signale T-Zellen effizienter aktiviert werden. Entscheidender als der Phänotyp dieser CD8⁺ ZNS-Population ist jedoch ihre Funktionalität und Kapazität zur Suppression MOG₃₅₋₅₅-spezifischer CD4⁺ T-Zellen. Nur *ex vivo* aus ZNS-Material isolierte CD8⁺ T-Zellen von i.z. DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten Mäusen waren in der Lage, *in vitro* die Proliferation autoreaktiver T-Zellen zu inhibieren und so ihre Expansion zu limitieren. Damit konnte für B7-H1 auf i.z. DZ, unabhängig von ihrem Reifegrad, eine selektive, inhibitorische Rolle der CD8⁺ T-Zell-Aktivierung, Rekrutierung und Expansion im ZNS EAE-immunisierter Mäuse gezeigt werden.

Es stellt sich die Frage, ob diese CD8⁺ Treg Antigen-spezifisch aktiviert werden müssen und ob die Suppression selbst in Abhängigkeit von MHC I/MHC II-Restriktion stattfindet. Die Induktion enzephalogener, MOG₃₅₋₅₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung von C57BL/6 Mäusen konnte ebenso gezeigt werden wie die Fähigkeit eines trunkierten MOG-Peptids MOG₄₀₋₅₄, mit einer hohen Bindungsaffinität an MHC I-Moleküle zu binden und Neuroinflammation zu erzeugen (Sun et al., 2001; Sun et al., 2003). Somit erscheint eine parallel zur Aktivierung enzephalogener CD4⁺ T-Zellen ablaufende Induktion von CD8⁺ T-Zellen durch das gleiche Peptid plausibel, die suppressive Kapazität dieser Zellen könnte einen negativen Rückkopplungsmechanismus zur Regulation autoreaktiver Immunantworten darstellen. Gleichzeitig gibt die Tatsache, dass auch unter DZ[wt]-Injektion CD8⁺ Treg im ZNS vorhanden, jedoch funktionell inaktiv sind, Hinweise auf die Bedeutung von B7-H1 als inhibitorisches Signal zur Restriktion CD8⁺ Treg im Zielorgan neuronaler Inflammation. Im humanen System konnte demonstriert werden, dass Oberflächenmoleküle wie ILT-3 und ILT-4 durch Alloantigen-spezifische, regulatorische CD8⁺CD28⁻ T-Zellen auf Monozyten und DZ hochreguliert werden können (Chang et al., 2002). So können in APZ tolerogene Eigenschaften hervorrufen werden, die in einer Reduktion der Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle und Induktion von Anergie in Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen resultieren. Die Übertragbarkeit dieses indirekten Wirkmechanismus von CD8⁺ Treg auf ZNS-APZ, die folglich PIR-Moleküle hochregulieren und damit indirekt MOG₃₅₋₅₅-spezifische CD4⁺ T-Zellen supprimieren können, wäre denkbar.

4.3.2 B7-H1 auf tolerogenen intravenös applizierten DZ

Basierend auf Vorarbeiten von Menges et al. und Wiethe et al. wurde der EAE-Verlauf nach i.v. TNF α -DZ Injektion von B7-H1-defizienten DZ und der Einfluss von B7-H1 auf die Mechanismen der Protektion untersucht (Menges et al., 2002; Wiethe et al., 2007). Beim direkten Vergleich der protektiven Kapazität von wt und B7-H1^{-/-} DZ fiel auf, dass Mäuse nach DZ[wt]-Injektion zwar weniger stark erkrankten als in der PBS-Kontrollgruppe, jedoch nicht komplett gesund blieben. Im Gegensatz dazu vermittelte DZ[B7-H1^{-/-}]-Injektion volle Protektion gegen EAE. Anders als nach i.z. Injektion TNF α -behandelter DZ, wo der Effekt i.z. DZ in erster Linie auf den Beginn der Krankheit, nicht jedoch auf die Schwere der klinischen Symptome Einfluss hatte, begann die Krankheit nach i.v. DZ-Gabe simultan in allen untersuchten Gruppen. Dies spricht gegen Differenzen bezüglich der Kinetik der induzierten proinflammatorischen Immunantwort, sondern favorisiert CD4⁺ Effektorzell-modulierende Mechanismen als Vermittler der Protektion. Die Notwendigkeit der Beladung tolerogener DZ mit Neuroantigen zur Modulation des EAE-Verlaufs weist darauf hin, dass an der Protektion beteiligte regulatorische Zelltypen ebenfalls Antigen-spezifisch aktiviert werden oder zumindest durch sog. Bystander-Aktivierung neben MOG₃₅₋₅₅-spezifischen T-Zellen stimuliert werden müssen. Um die *in vivo* Polarisation der nach Immunisierung induzierten Effektorzellen den Subtypen der proinflammatorischen Th1-/Th17-Zellen, den antiinflammatorischen Th2-Zellen oder anderen regulatorischen T-Zellpopulationen zuordnen zu können, wurden Restimulationsassays mit dem bekannten Neuroantigen durchgeführt und die Zytokinprofile untersucht. Auffallend hierbei war die Antigen-unabhängige, spontane Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und IL-13, die speziell nach TNF α -DZ-Injektion in den untersuchten Mäusen auftrat, jedoch in Abwesenheit von B7-H1 auf DZ verstärkt war. In Übereinstimmung mit der Literatur spricht dies für ein *per se* durch die Injektion tolerogener DZ verändertes peripheres Zytokinmilieu, das eine Verschiebung hin zu protektiven Tr1-/Th2-Zelltypen vermuten lässt (Wiethe et al., 2007). Gleichzeitig wurden in der Peripherie TNF α -DZ injizierter Mäuse geringere Konzentrationen an proinflammatorischem IL-17 detektiert, die selektiv nur nach Antigengabe von MOG₃₅₋₅₅ nachweisbar waren. Auch hier hatte B7-H1 Defizienz auf TNF α -DZ eine Verstärkung des Effekts zur Folge. Während für IFN γ keine Unterschiede zwischen der PBS-Gruppe und DZ[wt]-Empfängertieren ausgemacht werden konnten, bewirkte DZ[B7-H1^{-/-}]-Injektion selektiv eine Reduktion des IFN γ -Levels restimulierter Splenozyten.

Zusammengefasst zeigen diese Beobachtungen, dass das normalerweise nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅/CFA induzierte, proinflammatorische Milieu, gekennzeichnet durch hohe, peri-

phere Konzentrationen von $\text{IFN}\gamma$ und IL-17, zu einem antiinflammatorischen Milieu hin verschoben wurde, in dem vermutlich Tr1- und Th2-Zellen die Quelle von entzündungshemmenden Signalstoffen wie IL-10 und IL-13 darstellen. Der Hypothese folgend schränkt B7-H1 als inhibitorisches Molekül die Induktion solcher für die EAE-Protektion wirksamen T-Zell-Populationen ein, wohingegen diese unter Bedingungen der B7-H1-Defizienz effektiver aktiviert werden können und eine Verstärkung der Tr1/Th2-Verlagerung hervorrufen.

Es ist bekannt, dass Th1- und Th2-Zellen über einen positiven Rückkopplungsmechanismus, der zytokinabhängig die Aktivierung ihrer für die Differenzierung essentiellen Transkriptionsfaktoren bewirkt, ihre eigene Polarisierung steuern können, während die Differenzierung zu anderen Th-Subtypen inhibiert wird (Harrington et al., 2006). Ebenso konnte eine Regulation der Differenzierung naiver T-Zellen zu Th17-Zellen durch Th1-/Th2-typische Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$ und IL-4 nachgewiesen werden (Harrington et al., 2005). Diese Beobachtungen stellen eine Erklärung für die reduzierten Frequenzen $\text{IFN}\gamma$ - bzw. IL-17-produzierender T-Zellen in den untersuchten Mäusen dar. Durch die im Fall von $\text{TNF}\alpha$ -DZ-Injektion erhöhten antiinflammatorischen Zytokine entsteht in der Peripherie ein Milieu, das die Entwicklung von Tr1/Th2-Zellen favorisiert und gleichzeitig auch Th1-/Th17-Zellen unterdrückt. Der B7-H1/PD-1-Signalweg scheint hier insbesondere für die Differenzierung von Th1-Zellen eine Rolle zu spielen, da experimentell nur unter $\text{TNF}\alpha$ -DZ[B7-H1^{-/-}]-Injektion eine Reduktion von $\text{IFN}\gamma$ nachgewiesen werden konnte.

Die aus der Peripherie erhobenen Daten zur Charakterisierung des Zytokinmilieus stehen in direkter Korrelation mit dem EAE-Verlauf, der eine verbesserte protektive Kapazität für B7-H1-defiziente tolerogene DZ deutlich macht. Entscheidender Parameter der ZNS Inflammation und damit der neuronalen Schädigung während der EAE sind die Frequenz enzephalitogener T-Zellen im Zielorgan sowie ihre regulatorische bzw. immunogene Funktionalität. Es zeigte sich, dass $\text{CD4}^+\text{FoxP3}^+$ T-Zellen nicht an der lokalen Protektion gegen CD4^+ Effektorzellen beteiligt sind, da ihre Population anders als erwartet speziell im ZNS von PBS- bzw. DZ[wt]-injizierten Mäusen expandiert war. Lediglich nach DZ[B7-H1^{-/-}]-Injektion konnten mit ca. 5% normale Level von $\text{CD4}^+\text{FoxP3}^+$ Treg detektiert werden (Korn et al., 2007). Möglicherweise ist der Anstieg von ZNS-Treg ein Resultat der gesteigerten systemischen Entzündungsprozesse, einer stärkeren Induktion und verbesserten Migration von Treg, die als negative Rückkopplungsmechanismen zur Limitation der Inflammation im Zielorgan beitragen sollen. Die essentielle Beteiligung von B7-H1 auf DZ für die *in vitro* und *in vivo* Konversion von adaptiven Treg, die in der Peripherie aus naiven $\text{CD4}^+\text{FoxP3}^-$ T-

Zellen unter suboptimaler Antigenstimulation entstehen können, konnte kürzlich in einem Tumor-induzierten Modell gezeigt werden (Wang et al., 2008). Ebenso lassen Studien mit Transplantationsmodellen Rückschlüsse auf die wichtige Rolle des B7-H1/PD-1-Signalwegs für die Suppression alloreaktiver T-Zellen zu (Kitazawa et al., 2007). Durch Injektion von PBS bzw. DZ könnten adaptive FoxP3⁺ Treg gebildet werden, die zur Limitation der Gewebeschädigungen durch autoreaktive Effektorzellen ins ZNS rekrutiert werden. Abwesenheit von B7-H1 auf DZ könnte den Induktionsprozess inhibieren und ihre Funktionalität einschränken. Allerdings scheinen diese Treg keinen wesentlichen Beitrag zur EAE-Pathogenese und Reduktion der klinischen Symptome zu leisten, da Tiere der Versuchsgruppe mit der niedrigsten Frequenz im ZNS vor der Erkrankung protektiert waren, während erhöhte i.z. Treg-Level mit schwereren klinischen Symptomen korrelierten.

Bei Betrachtung der insgesamten Populationsgrößen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den verschiedenen Gruppen fiel auf, dass keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Gesamtinfiltration von Immunzellen des ZNS messbar waren. Die großen Differenzen der klinischen Resultate sprachen jedoch für ein deutliches proinflammatorisches Zytokinmilieu in den nicht-protektierten Mäusen, während Tiere der DZ[B7-H1^{-/-}] Gruppe weniger Th1-/Th17-Zellen im Zielorgan aufweisen sollten. Entsprechend der Hypothese konnte eine drastische Reduktion IFN γ -produzierender T-Zellen im ZNS von DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierten Mäusen gefunden werden, ebenso ein tendenzieller Rückgang IL-17-produzierender T-Zellen. Hohe Varianzen innerhalb der Versuchsgruppe ließen für DZ[wt]-injizierte Mäuse im Vergleich zur PBS-Gruppe keine signifikanten Reduktionen bezüglich IFN γ - und IL-17-produzierender T-Zellen zu, dennoch war auch hier ein negativer Trend sichtbar.

Insgesamt betrachtet konnte also die initiale Veränderung des peripheren Zytokinmilieus durch vermehrte Sekretion von Th2/Tr1-Zytokinen eine partielle Verschiebung des Effektorzelltyps vom normalerweise nach EAE-Immunisierung vorliegenden IFN γ^{hoch} /IL-17^{hoch} zum protektiven IL-13^{hoch}/IL-10^{hoch} bewirken, was in einer attenuierten EAE-Pathogenese resultierte.

Es stellt sich die Frage, wie das zur Polarisation naiver T-Zellen zu Tr1-/Th2-Zellen notwendige Zytokinmilieu entsteht und durch B7-H1 auf DZ moduliert werden kann. Es ist bekannt, dass iNKT-Zellen und CD1d-restringierte T-Zellen rasch nach Aktivierung durch TZR-Ligation große Mengen an Zytokinen wie IFN γ , IL-4, IL-10 und IL-13 sezernieren können und somit adaptive Immunantworten wie die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen beeinflussen (Bendelac et al., 2007; Godfrey et al., 2000; Sharif et al., 2002). Durch die Freisetzung verschiedener Zytokine können darüber hinaus andere Komponenten des

angeborenen und adaptiven Immunsystems wie NK-Zellen, DZ, B-Zellen und T-Zellen aktiviert werden und auf humoraler wie zellulärer Ebene Immunantworten modulieren (El Behi et al., 2005). Für eine zentrale Rolle von iNKT-Zellen bei der Regulation von Autoimmunantworten sprechen EAE-Studien in verschiedenen Mausmodellen, in denen Erhöhung der Frequenz von NKT-Zellen bzw. Verstärkung ihrer Funktionalität den EAE-Verlauf begünstigten (Mars et al., 2002; Pal et al., 2001). Außerdem konnte in MS-Patienten eine direkte Korrelation zwischen eingeschränkter Frequenz bzw. Funktionalität von NKT-Zellen und dem verschlechterten klinischen Bild hergestellt werden (Illes et al., 2000). Nachdem eine Beteiligung von iNKT-Zellen an der Protektion gegen EAE durch tolerogene DZ gezeigt werden konnte, wurde dieser Zelltyp neben CD1d-restringierten T-Zellen auch in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von CD1d^{-/-} Mäusen als Empfängertieren von TNF α -DZ-Injektionen untersucht (Wiethe et al., 2007). Bemerkenswerterweise konnte in CD1d^{-/-} Mäusen anders als in wt Mäusen kein signifikanter Anstieg der IL-4 und IL-13 Konzentrationen im Serum TNF α -DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierter Mäuse zwei Stunden nach der letzten Injektion detektiert werden, was auf eine ausbleibende Aktivierung von iNKT-Zellen und/oder CD1d-restringierten T-Zellen im Vergleich zu DZ[wt]-injizierten Mäusen hinwies. Die Verwendung von selektiv iNKT-Zell-defizienten J α 281^{-/-} Mäusen dagegen zeigte schließlich, dass die Abwesenheit von B7-H1 nicht iNKT-Zellen, sondern nur CD1d-restringierte T-Zellen moduliert. Damit konnten CD1d-restringierte T-Zellen als primäre Zytokinproduzenten identifiziert werden, die das periphere Zytokinprofil in Th2-Richtung verlagerten und in Abwesenheit von inhibitorischem B7-H1 auf APZ verstärkter aktiviert wurden.

Basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen Daten wird deshalb postuliert, dass B7-H1 auf tolerogenen DZ sowohl für die Aktivierung MOG₃₅₋₅₅-spezifischer Tr1-Zellen (gekennzeichnet durch ein hohes Sekretionspotenzial für IL-10), als auch CD1d-restringierter T-Zellen (gekennzeichnet durch die Sekretion großer Mengen IL-4 und IL-13) von entscheidender Bedeutung für die Ausgestaltung der nachfolgend durch EAE-Immunsierung induzierten Autoimmunreaktion sind (siehe auch Abb. 4.1). Beide T-Zell-Subpopulationen tragen durch die Sekretion spezifischer, antiinflammatorischer Zytokine zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der EAE zur Limitation der Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktionen von Th1/Th17-Zellen bei. Über positive und wechselseitige Rückkopplungsmechanismen modulieren sich Tr1/Th2 und CD1d-restringierte T-Zellen intrinsisch und führen möglicherweise so zu einer Potenzierung ihrer protektiven Effekte. Während der frühen Phase der Immunantwort kommt CD1d-restringierten T-Zellen eine besondere Rolle zu, da sie durch die Erzeugung eines intermediären Th2-Milieus mit hohen Konzentrationen an IL-4 und IL-13

die Voraussetzungen für die nachfolgende Differenzierung von $CD4^+IL-10^+$ T-Zellen schaffen. B7-H1-vermittelte Kostimulation durch DZ stellt dabei einen limitierenden Faktor bei der Induktion protektiver T-Zell-Populationen dar. Da sowohl CD1d-restringierte T-Zellen als auch konventionelle T-Zellen PD-1 exprimieren können, hat die Rezeptor-Ligation mit B7-H1 eine Inhibition der Aktivierung von CD1d-restringierten T-Zellen und Tr1-Zellen zur Folge, was wiederum in einer Einschränkung der protektiven Kapazität dieser T-Zellpopulationen resultiert. DZ bilden damit die Brücke zwischen adaptiver und angeborener Immunität, was die Notwendigkeit der simultanen und voneinander abhängigen Aktivierung CD1d-restringierter T-Zellen und MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zellen durch dieselbe DZ deutlich macht (Wiethe et al., 2007).

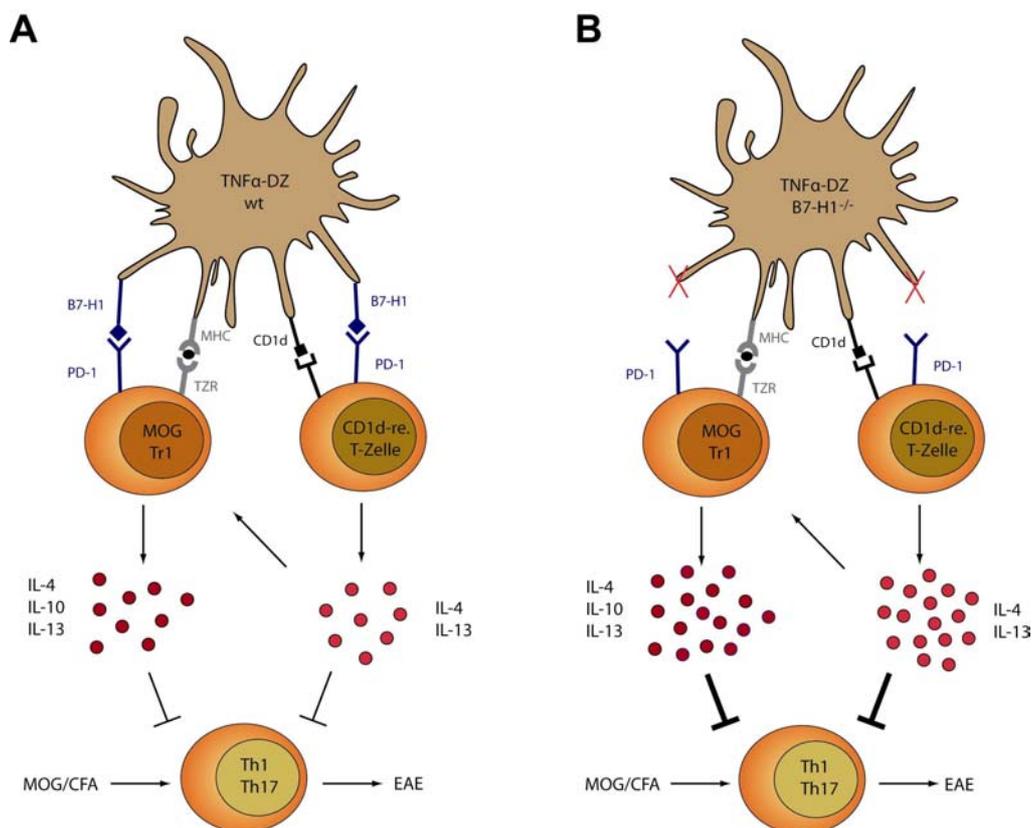


Abb. 4.1: Modell zur Wirkungsweise TNF α -behandelter DZ auf die an der EAE-Protektion beteiligten Mechanismen und ihre Modulation durch Expression von B7-H1. (A) Unter physiologischen Bedingungen können TNF α -maturierte DZ als APZ MOG₃₅₋₅₅-spezifische, $CD4^+IL-10^+$ T-Zellen und CD1d-restringierte (CD1d-re.) T-Zellen simultan aktivieren. Aktivierte Tr1-Zellen und CD1d-restringierte T-Zellen regulieren durch Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 sowohl ihre eigene Proliferation, als auch die Polarisation von konventionellen, naiven T-Zellen zu Th1/Th17-Effektorzellen, die nach EAE-Immunisierung induziert werden. (B) In Abwesenheit von inhibitorischen Molekülen wie B7-H1 auf der Oberfläche der APZ kann dieser Prozess noch effektiver ablaufen und resultiert in einer stärkeren Restriktion enzephalitogener T-Zellen bzw. Abmilderung der klinischen Symptome.

Unklar bleibt jedoch, welches der natürliche Ligand der CD1d-restringierten T-Zellen im vorliegenden Krankheitsmodell ist. Untersuchungen von Godfrey et al. weisen jedoch darauf hin, dass Glycolipide aus dem ZNS CD1d-restringierte T-Zellen stimulieren können (Godfrey and Kronenberg, 2004). Ob und welche Rolle solche aus dem Myelin abgeleiteten Sulfatide für die Pathogenese von MS spielen, muss noch geklärt werden.

4.4 Ausblick

Bedingt durch die weitverbreitete Expression von Ligand und Rezeptor im Organismus beeinflussen B7-H1/PD-1 Interaktionen zahlreiche, diverse immunregulatorische Mechanismen wie die autoreaktive Inflammation, Tumormunität, Immunität gegenüber infektiös-mikrobiellen Substanzen, Transplantationsimmunität, chronische Viruserkrankungen und Allergie (Okazaki and Honjo, 2007). In der Vergangenheit zeigten zahlreiche Studien die Beteiligung des B7-H1/PD-1 Signalwegs bei der Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz, wobei das Konzept der bidirektionalen Signalwirkung sowohl auf T-Zellen als auch auf DZ vermehrt postuliert wird (Keir et al., 2007; Okazaki and Honjo, 2007). Es erscheint plausibel, dass B7-H1 auf der Oberfläche von DZ nicht nur über Aktivierung oder Anergie von T-Zellen entscheidet, sondern durch Rezeptorligation die DZ selbst funktionell modifiziert (Kuipers et al., 2006). Zusätzliche Komplexität erhielt der B7-H1/PD-1-Regulationsweg mit der Entdeckung von B7.1 als zweitem Rezeptor von B7-H1 und der derzeitig postulierten, jedoch noch nicht bewiesenen Existenz eines weiteren Rezeptors für B7-H1 (Butte et al., 2007; Dong et al., 2002).

Trotz intensiver bisheriger Forschung sind weitere Studien für das tiefere Verständnis nötig, wann und wie dieser Signalweg seine inhibitorischen Eigenschaften am effektivsten einbringt und welche Therapiemöglichkeiten sich durch seine Manipulation ergeben. Ebenfalls stellen ZNS-DZ durch ihren wesentlichen Beitrag zur Neuroinflammation nach gezielter Modulation wichtiger kostimulatorischer Signalmoleküle mögliche Zielstrukturen einer Therapie dar. Einen ersten therapeutischen Ansatz im murinen System verfolgten Hirata et al. mit B7-H1-überexprimierenden DZ, indem zunächst embryonale Stammzellen mit Expressionsvektoren für B7-H1 in Kombination mit MOG:MHC II-Molekül-Komplexen transfiziert wurden (Hirata et al., 2005). Doppelt transfizierte Stammzellen wurden anschließend zu DZ ausdifferenziert und i.p. in EAE-immunisierte Empfängermäuse appliziert. Daraus resultierte die Abschwächung der EAE sowie der ZNS-Inflammation durch Induktion von Anergie in Antigen-spezifischen T-Zellen.

Darüber hinaus könnten immunitätssteigernde PD-1 Antagonisten zur Therapie von Krebserkrankungen und Infektionskrankheiten eingesetzt werden, wohingegen die Immunantwort dämpfende PD-1 Agonisten Anwendung bei Autoimmunität, Allergie und in der Transplantationsmedizin finden könnten. Ebenso bieten Ansätze zur Bindungsaffinitätserhöhung durch Tetramerisierung von B7-H1/PD-1 oder durch Mutation von für die Interaktion essentiellen Proteinregionen therapeutische Möglichkeiten (Terawaki et al., 2007; Wang et al., 2003). Ein vielversprechender Ansatz ergibt sich aus der Anwendung eines antagonistischen, humanisierten PD-1 Antikörpers, der 2006 für die klinische Phase I-Testung an Krebspatienten zugelassen wurde und für den eine gute Verträglichkeit sowie erste Antitumoraktivität beschrieben wurde.

5 Zusammenfassung

Das koinhibitorische Molekül B7-H1 beeinflusst adaptive Immunantworten und ist vermutlich an den Mechanismen zur Aufrechterhaltung peripherer Toleranz und der Limitierung inflammatorischen Schadens beteiligt. Zusätzlich kommt DZ eine entscheidende Bedeutung in der Entwicklung, Aufrechterhaltung und Regulation ZNS-spezifischer Autoimmunität und Inflamationsprozessen zu.

Um den B7-H1/PD-1-Signalweg eingehender zu untersuchen, wurden adaptive Immunantworten und die Zielorgan-spezifische Infiltration im Modell der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE analysiert, einem Tiermodell der MS, das durch neurologische Schädigungen und progressive Paralyse bedingt durch die inflammatorische Demyelinisierung im ZNS charakterisiert ist. Im Vergleich zu Wildtyptieren zeigten B7-H1^{-/-} Mäuse einen beschleunigten Krankheitsbeginn und eine signifikante Steigerung des Schweregrads der EAE. Periphere MOG₃₅₋₅₅-spezifische IFN γ -/IL-17-Immuneantworten traten in B7-H1^{-/-} Mäusen verfrüht und verstärkt auf, klangen allerdings auch schneller ab. Im ZNS persistierte jedoch eine signifikant höhere Anzahl aktivierter, Neuroantigen-spezifischer T-Zellen während allen Phasen der EAE, wobei diese Zellen ebenfalls größere Mengen proinflammatorischer Zytokine sezernieren konnten. Experimente mit APZ-assoziiertem B7-H1, die einen direkten inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung und Proliferation MOG₃₅₋₅₅-spezifischer Effektorzellen zeigten, unterstützen die Hypothese, dass parenchymale Expression von B7-H1 ausschlaggebend für das Schicksal von T-Zellen im Zielorgan ist. B7-H1 stellt damit ein Schlüsselmolekül für die Kontrolle parenchymaler Immunreaktionen dar.

Nachdem die Relevanz von B7-H1 auf APZ *in vitro* bewiesen werden konnte, wurde der Einfluss von B7-H1 auf systemisch oder intrazerebral injizierten DZ mit immunogenem oder tolerogenem Phänotyp untersucht. Intravenöse Applikation von tolerogenen B7-H1^{-/-} DZ resultierte in einer besseren Protektion gegen EAE, und dieser Effekt war von einer gesteigerten Produktion Tr1-/Th2-typischer Zytokine sowie einer verstärkten Sekretion von IL-4 und IL-13 durch CD1d-restringierte T-Zellen in der Peripherie begleitet. Die Anzahl Neuroantigen-spezifischer T-Zellen, die proinflammatorische Zytokine sezernierten, war dementsprechend sowohl in der Peripherie als auch im ZNS reduziert. In diesem Zusammenhang konnte für B7-H1 eine wesentliche Beteiligung an der Inhibition der Aktivierung antigen-spezifischer, regulatorischer T-Zellen und CD1d-restringierter T-Zellen gefunden werden.

Bei der Injektion intrazerebraler DZ bewirkten tolerogene DZ im Vergleich zu immunogenen DZ eine Reduktion der ZNS-Infiltration mit CD4⁺ T-Zellen in der frühen Phase der Erkrankung. Außerdem konnte eine Veränderung des intrazerebralen Zytokinmilieus von IFN γ ^{hoch}/IL-17^{hoch} exprimierenden enzephalitogenen T-Zellen zu IL-10^{hoch} regulatorischen T-Zellen gezeigt werden. B7-H1-Defizienz auf APZ verstärkte diesen Effekt und führte dadurch in den Mäusen zur partiellen Protektion gegen klinische Symptome der EAE. Zusätzlich wurde die Beteiligung von B7-H1 an der Rekrutierung und ZNS-lokalisierten Induktion der Proliferation CD8⁺ regulatorischer T-Zellen durch DZ beschrieben. Unabhängig vom Phänotyp der DZ wurde eine bereits in der frühen Phase vorhandene und dauerhaft expandierende Population von CD8⁺ T-Zellen im ZNS DZ[B7-H1^{-/-}]-injizierter Mäuse gefunden. Diese Zellen konnten *in vitro* die Proliferation MOG₃₅₋₅₅-spezifischer CD4⁺ T-Zellen supprimieren und wirkten so mutmaßlich an der Abmilderung der EAE mit.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die entscheidende Bedeutung von B7-H1 auf DZ als immuninhibitorisches Molekül, das sowohl enzephalitogene als auch regulatorische T-Zell-Antworten moduliert und damit zur Limitation von Immunantworten beiträgt.

6 Abstract

The coinhibitory B7-H1 molecule influences adaptive immune responses and has been proposed to contribute to the mechanisms maintaining peripheral tolerance and limiting inflammatory damage in parenchymal organs. Additionally, DC emerge as crucial immune cell population during development, maintenance and regulation of CNS-specific autoimmunity and inflammation.

To further explore the B7-H1/PD1 pathway in CNS autoimmune inflammation, adaptive immune responses and target organ infiltration were analysed in MOG₃₅₋₅₅-induced EAE, an animal model of MS characterized by neurological impairment and progressive paralysis resulting from inflammatory demyelination in the CNS. In comparison to wildtype mice B7-H1^{-/-} mice exhibited an accelerated disease onset and significantly exacerbated EAE severity. Peripheral MOG₃₅₋₅₅-specific IFN γ /IL-17 T cell responses occurred earlier and enhanced in B7-H1^{-/-} mice, but ceased more rapidly. In the CNS, however, significantly higher numbers of activated neuroantigen-specific T cells persisted during all stages of EAE and were able to secrete higher amounts of proinflammatory cytokines.

Experiments showing a direct inhibitory role of APC-derived B7-H1 on the activation and proliferation of MOG₃₅₋₅₅-specific effector cells support the assumption that parenchymal B7-H1 is pivotal for delineating T cell fate in the target organ. Therefore, B7-H1 represents a key molecule in the control of parenchymal immune reactions.

Having shown the critical relevance of B7-H1 on APC *in vitro*, the influence of B7-H1 expression on systemically or intracerebrally injected DC displaying an immunogenic or tolerogenic phenotype was investigated. Intravenous application of tolerogenic B7-H1^{-/-} DC resulted in a more efficient protection from EAE, accompanied by an increased peripheral production of Tr1/Th2 cytokines and a pronounced secretion of IL-4 and IL-13 by CD1d-restricted T cells. In accordance, numbers of neuroantigen-specific T cells secreting proinflammatory cytokines were reduced both in the periphery and in the CNS. Here, a substantial contribution of B7-H1 to inhibition of activation of antigen-specific, regulatory T cells and CD1d-restricted T cells could be found.

Using intracerebral DC injections, a reduction of early CNS CD4⁺ T cell infiltration was shown for tolerogenic DC compared to immunogenic DC. Furthermore, alteration of the intracerebral cytokine milieu containing IFN γ ^{high}/IL-17^{high} encephalitogenic T cells to IL-10^{high} regulatory T cells was demonstrated. B7-H1 deficiency on DC enhanced this effect, thereby mediating partial protection of mice from clinical signs of EAE. Additionally,

involvement of B7-H1 expression on the ability of DC to recruit and induce proliferation of CD8 regulatory T cells locally in the CNS was described. Regardless of DC phenotype, an early and consistently expanding population of CD8⁺ T cells was observed in the CNS of DC[B7-H1^{-/-}]-injected mice, which was able to suppress proliferation of MOG₃₅₋₅₅-specific CD4⁺ T cells *in vitro* and thus probably contributes to EAE amelioration *in vivo*.

Taken together, the findings of this study demonstrate the critical importance of DC-derived B7-H1 as an immune-inhibitory molecule capable of modulating both encephalitogenic and regulatory T cell responses thus contributing to the confinement of immune responses.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Lohr, J., Knoechel, B. and Nagabhushanam, V., 2004. T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 3(7-8): 471-5.
- Adema, G.J. et al., 1997. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*, 387(6634): 713-7.
- Aicher, A. et al., 2000. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol*, 164(9): 4689-96.
- Alam, R., 1998. A brief review of the immune system. *Prim Care*, 25(4): 727-38.
- Anderton, S.M. and Wraith, D.C., 2002. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*, 2(7): 487-98.
- Ansari, M.J. et al., 2003. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med*, 198(1): 63-9.
- Ardavin, C., Amigorena, S. and Reis e Sousa, C., 2004. Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity*, 20(1): 17-23.
- Augello, A. et al., 2005. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*, 35(5): 1482-90.
- Bailey, S.L., Carpentier, P.A., McMahon, E.J., Begolka, W.S. and Miller, S.D., 2006. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol*, 26(2): 149-88.
- Bailey, S.L., Schreiner, B., McMahon, E.J. and Miller, S.D., 2007. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol*, 8(2): 172-80.
- Banchereau, J. et al., 2003. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci*, 987: 180-7.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673): 245-52.
- Barber, D.L. et al., 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439(7077): 682-7.
- Bauer, J., Wekerle, H. and Lassmann, H., 1995. Apoptosis in brain-specific autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*, 7(6): 839-43.

- Becher, B., Bechmann, I. and Greter, M., 2006. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med*, 84(7): 532-43.
- Begolka, W.S., Vanderlugt, C.L., Rahbe, S.M. and Miller, S.D., 1998. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. *J Immunol*, 161(8): 4437-46.
- Beier, K.C. et al., 2000. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol*, 30(12): 3707-17.
- Ben-Nun, A. and Cohen, I.R., 1982. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated by T cell lines: process of selection of lines and characterization of the cells. *J Immunol*, 129(1): 303-8.
- Bendelac, A., Savage, P.B. and Teyton, L., 2007. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*, 25: 297-336.
- Bettelli, E., Baeten, D., Jager, A., Sobel, R.A. and Kuchroo, V.K., 2006a. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J Clin Invest*, 116(9): 2393-402.
- Bettelli, E. et al., 2006b. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090): 235-8.
- Bettelli, E. et al., 1998. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol*, 161(7): 3299-306.
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T. and Bruck, W., 2000. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain*, 123 (Pt 6): 1174-83.
- Boise, L.H. et al., 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*, 3(1): 87-98.
- Borriello, F. et al., 1997. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, 6(3): 303-13.
- Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Gray, G., Gribben, J. and Nadler, L.M., 1993. B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance. *J Exp Med*, 178(5): 1753-63.
- Bretscher, P. and Cohn, M., 1970. A theory of self-nonsel discrimination. *Science*, 169(950): 1042-9.

- Brocker, T., 1997. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med*, 186(8): 1223-32.
- Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H. and Freeman, G.J., 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, 27(1): 111-22.
- Carter, L. et al., 2002. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol*, 32(3): 634-43.
- Chambers, C.A., 2001. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol*, 22(4): 217-23.
- Chang, C.C. et al., 2002. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol*, 3(3): 237-43.
- Chapoval, A.I. et al., 2001. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol*, 2(3): 269-74.
- Chen, L., 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*, 4(5): 336-47.
- Chen, W. et al., 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198(12): 1875-86.
- Chicha, L., Jarrossay, D. and Manz, M.G., 2004. Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J Exp Med*, 200(11): 1519-24.
- Chu, C.Q., Wittmer, S. and Dalton, D.K., 2000. 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*, 192(1): 123-8.
- Clark, E.A. and Ledbetter, J.A., 1994. How B and T cells talk to each other. *Nature*, 367(6462): 425-8.
- Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F. and Berneman, Z.N., 2007. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol*, 2007: 89195.
- Coyle, A.J. and Gutierrez-Ramos, J.C., 2001. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol*, 2(3): 203-9.

- Coyle, A.J. et al., 2000. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity*, 13(1): 95-105.
- Cua, D.J. et al., 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421(6924): 744-8.
- Dalakas, M.C., 2006. B cells in the pathophysiology of autoimmune neurological disorders: a credible therapeutic target. *Pharmacol Ther*, 112(1): 57-70.
- Davidson, N.J., Fort, M.M., Muller, W., Leach, M.W. and Rennick, D.M., 2000. Chronic colitis in IL-10^{-/-} mice: insufficient counter regulation of a Th1 response. *Int Rev Immunol*, 19(1): 91-121.
- de Visser, K.E. et al., 2001. Low-avidity self-specific T cells display a pronounced expansion defect that can be overcome by altered peptide ligands. *J Immunol*, 167(7): 3818-28.
- Diao, J., Winter, E., Chen, W., Cantin, C. and Catral, M.S., 2004. Characterization of distinct conventional and plasmacytoid dendritic cell-committed precursors in murine bone marrow. *J Immunol*, 173(3): 1826-33.
- Dittel, B.N., Visintin, I., Merchant, R.M. and Janeway, C.A., Jr., 1999. Presentation of the self antigen myelin basic protein by dendritic cells leads to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 163(1): 32-9.
- Dong, C., 2008. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*, 8(5): 337-48.
- Dong, H. et al., 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*, 8(8): 793-800.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. and Chen, L., 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*, 5(12): 1365-9.
- Dudziak, D. et al., 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*, 315(5808): 107-11.
- Ebers, G.C., Sadovnick, A.D. and Risch, N.J., 1995. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature*, 377(6545): 150-1.
- El Behi, M. et al., 2005. New insights into cell responses involved in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Lett*, 96(1): 11-26.
- Endharti, A.T. et al., 2005. Cutting edge: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8⁺ T cells. *J Immunol*, 175(11): 7093-7.

- Engelhardt, B., Martin-Simonet, M.T., Rott, L.S., Butcher, E.C. and Michie, S.A., 1998. Adhesion molecule phenotype of T lymphocytes in inflamed CNS. *J Neuroimmunol*, 84(1): 92-104.
- Enk, A.H., 2005. Dendritic cells in tolerance induction. *Immunol Lett*, 99(1): 8-11.
- Fazilleau, N. et al., 2007. T cell repertoire diversity is required for relapses in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 178(8): 4865-75.
- Fife, B.T., Paniagua, M.C., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L. and Karpus, W.J., 2001. Selective CC chemokine receptor expression by central nervous system-infiltrating encephalitogenic T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*, 66(4): 705-14.
- Fillatreau, S., Sweeney, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D. and Anderton, S.M., 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*, 3(10): 944-50.
- Fischer, F.R. et al., 2000. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: effect of altered peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression. *J Neuroimmunol*, 110(1-2): 195-208.
- Flugel, A. et al., 2001. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*, 14(5): 547-60.
- Freeman, G.J. et al., 1993. Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J Exp Med*, 178(6): 2185-92.
- Freeman, G.J. et al., 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192(7): 1027-34.
- Friedl, P., den Boer, A.T. and Gunzer, M., 2005. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*, 5(7): 532-45.
- Friese, M.A. and Fugger, L., 2005. Autoreactive CD8⁺ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain*, 128(Pt 8): 1747-63.
- Geginat, J. et al., 2000. CD28 and LFA-1 contribute to cyclosporin A-resistant T cell growth by stabilizing the IL-2 mRNA through distinct signaling pathways. *Eur J Immunol*, 30(4): 1136-44.
- Godfrey, D.I., Hammond, K.J., Poulton, L.D., Smyth, M.J. and Baxter, A.G., 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today*, 21(11): 573-83.

- Godfrey, D.I. and Kronenberg, M., 2004. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest*, 114(10): 1379-88.
- Gran, B. et al., 2002. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol*, 169(12): 7104-10.
- Greenwald, R.J., Boussiotis, V.A., Liorbach, R.B., Abbas, A.K. and Sharpe, A.H., 2001. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity*, 14(2): 145-55.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J. and Sharpe, A.H., 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23: 515-48.
- Greter, M. et al., 2005. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med*, 11(3): 328-34.
- Gross, J.A., Callas, E. and Allison, J.P., 1992. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J Immunol*, 149(2): 380-8.
- Guleria, I. et al., 2005. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med*, 202(2): 231-7.
- Gutcher, I. and Becher, B., 2007. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest*, 117(5): 1119-27.
- Hafler, D.A., 2004. Multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 113(6): 788-94.
- Harrington, L.E. et al., 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6(11): 1123-32.
- Harrington, L.E., Mangan, P.R. and Weaver, C.T., 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 18(3): 349-56.
- Hathcock, K.S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P. and Hodes, R.J., 1994. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med*, 180(2): 631-40.
- Heppner, F.L. et al., 2005. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med*, 11(2): 146-52.
- Hickey, W.F., 2001. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia*, 36(2): 118-24.
- Hickey, W.F., Hsu, B.L. and Kimura, H., 1991. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*, 28(2): 254-60.
- Hirata, S. et al., 2005. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte

- glycoprotein peptide along with TRAIL or programmed death-1 ligand. *J Immunol*, 174(4): 1888-97.
- Hofstetter, H.H. et al., 2005. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*, 237(2): 123-30.
- Hofstetter, H.H., Shive, C.L. and Forsthuber, T.G., 2002. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol*, 169(1): 117-25.
- Hogquist, K.A., Baldwin, T.A. and Jameson, S.C., 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*, 5(10): 772-82.
- Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S., 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609): 1057-61.
- Huang, D. et al., 2006. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *Faseb J*, 20(7): 896-905.
- Hutloff, A. et al., 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 397(6716): 263-6.
- Illes, Z. et al., 2000. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol*, 164(8): 4375-81.
- Ishida, M. et al., 2002. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett*, 84(1): 57-62.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. and Honjo, T., 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J*, 11(11): 3887-95.
- Izikson, L., Klein, R.S., Charo, I.F., Weiner, H.L. and Luster, A.D., 2000. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med*, 192(7): 1075-80.
- Janeway, C.A., Jr., Walport, M. and Shlomchik, M., 2001. *Immunobiology*. Garland Publishing, New York.
- Jones, D.E. and Diamond, A.G., 1995. The basis of autoimmunity: an overview. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 9(1): 1-24.

- Jones, R.E. et al., 2003. Epitope spreading is not required for relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 170(4): 1690-8.
- Kabat, E.A., Glusman, M. and Knaub, V., 1948. Immunochemical estimation of albumin and gamma globulin in normal and pathological cerebrospinal fluid. *Trans Am Neurol Assoc*, 73(73 Annual Meet.): 93.
- Karman, J. et al., 2006. Dendritic cells amplify T cell-mediated immune responses in the central nervous system. *J Immunol*, 177(11): 7750-60.
- Karman, J., Ling, C., Sandor, M. and Fabry, Z., 2004. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol*, 173(4): 2353-61.
- Karni, A. et al., 2006. Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. *J Immunol*, 177(6): 4196-202.
- Karpus, W.J. et al., 1995. An important role for the chemokine macrophage inflammatory protein-1 alpha in the pathogenesis of the T cell-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 155(10): 5003-10.
- Keir, M.E., Francisco, L.M. and Sharpe, A.H., 2007. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol*, 19(3): 309-14.
- Keir, M.E. et al., 2006. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med*, 203(4): 883-95.
- Kennedy, M.K., Torrance, D.S., Picha, K.S. and Mohler, K.M., 1992. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol*, 149(7): 2496-505.
- Kerlero de Rosbo, N., Mendel, I. and Ben-Nun, A., 1995. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes. *Eur J Immunol*, 25(4): 985-93.
- Khoury, S.J., Hancock, W.W. and Weiner, H.L., 1992. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med*, 176(5): 1355-64.
- Khoury, S.J. and Sayegh, M.H., 2004. The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity*, 20(5): 529-38.

- Kieseier, B.C. et al., 1998. Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 121 (Pt 1): 159-66.
- Kitazawa, Y. et al., 2007. Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation*, 83(6): 774-82.
- Kleindienst, P., Wiethe, C., Lutz, M.B. and Brocker, T., 2005. Simultaneous induction of CD4 T cell tolerance and CD8 T cell immunity by semimature dendritic cells. *J Immunol*, 174(7): 3941-7.
- Komiyama, Y. et al., 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 177(1): 566-73.
- Korn, T. et al., 2007. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med*, 13(4): 423-31.
- Krakowski, M. and Owens, T., 1996. Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, 26(7): 1641-6.
- Krummel, M.F. and Allison, J.P., 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*, 182(2): 459-65.
- Kuchroo, V.K. et al., 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*, 80(5): 707-18.
- Kuchroo, V.K. et al., 1993. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*, 151(8): 4371-82.
- Kuipers, H. et al., 2006. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. *Eur J Immunol*, 36(9): 2472-82.
- Kurtzke, J.F. and Bui Quoc, H., 1980. Multiple sclerosis in a migrant population: 2. Half-orientals immigrating in childhood. *Ann Neurol*, 8(3): 256-60.
- La Cava, A., Van Kaer, L. and Fu Dong, S., 2006. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol*, 27(7): 322-7.
- Lafaille, J.J. et al., 1997. Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J Exp Med*, 186(2): 307-12.
- Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M. and Tonegawa, S., 1994. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell*, 78(3): 399-408.

- Lafferty, K.J. and Cunningham, A.J., 1975. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 53(1): 27-42.
- Langrish, C.L. et al., 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201(2): 233-40.
- Lanzavecchia, A., Lezzi, G. and Viola, A., 1999. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell*, 96(1): 1-4.
- Latchman, Y. et al., 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*, 2(3): 261-8.
- Latchman, Y.E. et al., 2004. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29): 10691-6.
- Laurence, A. et al., 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26(3): 371-81.
- Lee, S.C. and Raine, C.S., 1989. Multiple sclerosis: oligodendrocytes in active lesions do not express class II major histocompatibility complex molecules. *J Neuroimmunol*, 25(2-3): 261-6.
- Lenschow, D.J. and Bluestone, J.A., 1993. T cell co-stimulation and in vivo tolerance. *Curr Opin Immunol*, 5(5): 747-52.
- Leung, H.T., Bradshaw, J., Cleaveland, J.S. and Linsley, P.S., 1995. Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high-avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail. *J Biol Chem*, 270(42): 25107-14.
- Liang, S.C. et al., 2003. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol*, 33(10): 2706-16.
- Ling, C., Sandor, M., Suresh, M. and Fabry, Z., 2006. Traumatic injury and the presence of antigen differentially contribute to T-cell recruitment in the CNS. *J Neurosci*, 26(3): 731-41.
- Linsley, P.S. et al., 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*, 1(9): 793-801.
- Linsley, P.S. et al., 1995. Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. *J Biol Chem*, 270(25): 15417-24.
- Lipscomb, M.F. and Masten, B.J., 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*, 82(1): 97-130.

- Liu, G.Y. et al., 1995. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity*, 3(4): 407-15.
- Loke, P. and Allison, J.P., 2003. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9): 5336-41.
- Lu, L.F. et al., 2006. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*, 442(7106): 997-1002.
- Lutz, M.B. et al., 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*, 223(1): 77-92.
- Lutz, M.B. and Schuler, G., 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*, 23(9): 445-9.
- Macatonia, S.E. et al., 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*, 154(10): 5071-9.
- Magnus, T. et al., 2005. Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. *J Neurosci*, 25(10): 2537-46.
- Mangan, P.R. et al., 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441(7090): 231-4.
- Mars, L.T. et al., 2002. Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 168(12): 6007-11.
- Martin-Fontecha, A. et al., 2003. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med*, 198(4): 615-21.
- Martin-Orozco, N., Wang, Y.H., Yagita, H. and Dong, C., 2006. Cutting Edge: Programmed death (PD) ligand-1/PD-1 interaction is required for CD8+ T cell tolerance to tissue antigens. *J Immunol*, 177(12): 8291-5.
- Matejuk, A., Vandenbark, A.A., Burrows, G.G., Bebo, B.F., Jr. and Offner, H., 2000. Reduced chemokine and chemokine receptor expression in spinal cords of TCR BV8S2 transgenic mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis with BV8S2 protein. *J Immunol*, 164(7): 3924-31.
- Matsui, T. et al., 2001. Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 alpha in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 125(1): 155-61.
- McAdam, A.J. et al., 2000. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J Immunol*, 165(9): 5035-40.

- McAdam, A.J. et al., 2001. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature*, 409(6816): 102-5.
- McKenzie, B.S., Kastelein, R.A. and Cua, D.J., 2006. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*, 27(1): 17-23.
- McMahon, E.J., Bailey, S.L., Castenada, C.V., Waldner, H. and Miller, S.D., 2005. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med*, 11(3): 335-9.
- McRae, B.L. et al., 1992. Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein. *J Neuroimmunol*, 38(3): 229-40.
- Mendiratta, S.K. et al., 1997. CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity*, 6(4): 469-77.
- Menges, M. et al., 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med*, 195(1): 15-21.
- Menke, J. et al., 2007. Programmed death 1 ligand (PD-L) 1 and PD-L2 limit autoimmune kidney disease: distinct roles. *J Immunol*, 179(11): 7466-77.
- Miller, S.D. and Eagar, T.N., 2001. Functional role of epitope spreading in the chronic pathogenesis of autoimmune and virus-induced demyelinating diseases. *Adv Exp Med Biol*, 490: 99-107.
- Miller, S.D. and Karpus, W.J., 1994. The immunopathogenesis and regulation of T-cell-mediated demyelinating diseases. *Immunol Today*, 15(8): 356-61.
- Miller, S.D., McMahon, E.J., Schreiner, B. and Bailey, S.L., 2007. Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci*, 1103: 179-91.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7: 145-73.
- Munn, D.H. et al., 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*, 297(5588): 1867-70.
- Najafian, N. et al., 2003. Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest*, 112(7): 1037-48.
- Nakae, S. et al., 2006. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J Immunol*, 176(4): 2238-48.

- Nakazawa, A. et al., 2004. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 126(5): 1347-57.
- Nishimura, H., Honjo, T. and Minato, N., 2000. Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. *J Exp Med*, 191(5): 891-8.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. and Honjo, T., 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11(2): 141-51.
- Nishimura, H. et al., 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*, 291(5502): 319-22.
- Ogasawara, K., Yoshinaga, S.K. and Lanier, L.L., 2002. Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN-gamma production in activated murine NK cells. *J Immunol*, 169(7): 3676-85.
- Okazaki, T. and Honjo, T., 2006. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol*, 27(4): 195-201.
- Okazaki, T. and Honjo, T., 2007. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol*, 19(7): 813-24.
- Olson, J.K., Ercolini, A.M. and Miller, S.D., 2005. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 296: 39-53.
- Ortler, S. et al., 2008. B7-H1 restricts neuroantigen-specific T cell responses and confines inflammatory CNS damage: implications for the lesion pathogenesis of multiple sclerosis. *Eur J Immunol*, 38(6): 1734-44.
- Pal, E. et al., 2001. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V alpha 14 NK T cells. *J Immunol*, 166(1): 662-8.
- Pardoll, D.M., 2002. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2(4): 227-38.
- Park, H. et al., 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6(11): 1133-41.
- Paust, S., Lu, L., McCarty, N. and Cantor, H., 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(28): 10398-403.
- Pender, M.P., McCombe, P.A., Yoong, G. and Nguyen, K.B., 1992. Apoptosis of alpha beta T lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis:

- its possible implications for recovery and acquired tolerance. *J Autoimmun*, 5(4): 401-10.
- Perkins, D. et al., 1996. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J Immunol*, 156(11): 4154-9.
- Pierre, P. et al., 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*, 388(6644): 787-92.
- Platten, M. and Steinman, L., 2005. Multiple sclerosis: trapped in deadly glue. *Nat Med*, 11(3): 252-3.
- Ponomarev, E.D. et al., 2007. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 178(1): 39-48.
- Prasad, D.V., Richards, S., Mai, X.M. and Dong, C., 2003. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. *Immunity*, 18(6): 863-73.
- Probert, L., Akassoglou, K., Pasparakis, M., Kontogeorgos, G. and Kollias, G., 1995. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(24): 11294-8.
- Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T. and van den Broek, M., 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol*, 6(3): 280-6.
- Raimondi, G., Shufesky, W.J., Tokita, D., Morelli, A.E. and Thomson, A.W., 2006. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4⁺CD25⁺ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol*, 176(5): 2808-16.
- Reichardt, H.M., Gold, R. and Luhder, F., 2006. Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert Rev Neurother*, 6(11): 1657-70.
- Reis e Sousa, C., 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*, 6(6): 476-83.
- Rifa'i, M., Kawamoto, Y., Nakashima, I. and Suzuki, H., 2004. Essential roles of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med*, 200(9): 1123-34.
- Rifa'i, M. et al., 2008. CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I- α betaTCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *Int Immunol*, 20(7): 937-47.

- Riley, J.L. et al., 2001. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol*, 166(8): 4943-8.
- Rocha, B. and von Boehmer, H., 1991. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science*, 251(4998): 1225-8.
- Rodig, N. et al., 2003. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. *Eur J Immunol*, 33(11): 3117-26.
- Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S. and Levings, M.K., 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*, 182: 68-79.
- Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 6(4): 345-52.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. and Ono, M., 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5): 775-87.
- Salama, A.D. et al., 2003. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 198(1): 71-8.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 179(4): 1109-18.
- Salomon, B. and Bluestone, J.A., 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol*, 19: 225-52.
- Saudemont, A., Jouy, N., Hetuin, D. and Quesnel, B., 2005. NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells. *Blood*, 105(6): 2428-35.
- Schreiner, B., Bailey, S.L., Shin, T., Chen, L. and Miller, S.D., 2008. PD-1 ligands expressed on myeloid-derived APC in the CNS regulate T-cell responses in EAE. *Eur J Immunol*.
- Schreiner, B. et al., 2004. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 155(1-2): 172-82.
- Serafini, B., Columba-Cabezas, S., Di Rosa, F. and Aloisi, F., 2000. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*, 157(6): 1991-2002.
- Setum, C.M., Serie, J.R. and Hegre, O.D., 1993. Dendritic cell/lymphocyte clustering: morphologic analysis by transmission electron microscopy and distribution of gold-

- labeled MHC class II antigens by high-resolution scanning electron microscopy. *Anat Rec*, 235(2): 285-95.
- Sharif, S., Arreaza, G.A., Zucker, P., Mi, Q.S. and Delovitch, T.L., 2002. Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells. *J Mol Med*, 80(5): 290-300.
- Sharpe, A.H. and Freeman, G.J., 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, 2(2): 116-26.
- Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R. and Freeman, G.J., 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*, 8(3): 239-45.
- Shevach, E.M., 2006. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*, 25(2): 195-201.
- Shevach, E.M., McHugh, R.S., Piccirillo, C.A. and Thornton, A.M., 2001. Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev*, 182: 58-67.
- Shrikant, P. and Benveniste, E.N., 1996. The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J Immunol*, 157(5): 1819-22.
- Sica, G.L. et al., 2003. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity*, 18(6): 849-61.
- Smith, P.A. et al., 2005. Epitope spread is not critical for the relapse and progression of MOG 8-21 induced EAE in Biozzi ABH mice. *J Neuroimmunol*, 164(1-2): 76-84.
- Sperling, A.I. and Bluestone, J.A., 2001. ICOS costimulation: It's not just for TH2 cells anymore. *Nat Immunol*, 2(7): 573-4.
- Sprent, J. and Kishimoto, H., 2001. The thymus and central tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1409): 609-16.
- Stassen, M. et al., 2004. Differential regulatory capacity of CD25⁺ T regulatory cells and preactivated CD25⁺ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells. *J Immunol*, 173(1): 267-74.
- Steinman, L., 1996. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*, 85(3): 299-302.
- Steinman, L., Martin, R., Bernard, C., Conlon, P. and Oksenberg, J.R., 2002. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci*, 25: 491-505.
- Steinman, R.M. and Cohn, Z.A., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 137(5): 1142-62.

- Steinman, R.M. and Witmer, M.D., 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(10): 5132-6.
- Suciu-Foca, N., Manavalan, J.S. and Cortesini, R., 2003. Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol*, 11(3-4): 235-44.
- Suh, W.K. et al., 2003. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol*, 4(9): 899-906.
- Sun, D. et al., 2001. Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol*, 166(12): 7579-87.
- Sun, D. et al., 2003. Encephalitogenic activity of truncated myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptides and their recognition by CD8⁺ MOG-specific T cells on oligomeric MHC class I molecules. *Int Immunol*, 15(2): 261-8.
- Suter, T. et al., 2003. The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation. *Eur J Immunol*, 33(11): 2998-3006.
- Swallow, M.M., Wallin, J.J. and Sha, W.C., 1999. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF α . *Immunity*, 11(4): 423-32.
- Tamura, H. et al., 2001. B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood*, 97(6): 1809-16.
- Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M. and Akdis, C.A., 2006. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology*, 117(4): 433-42.
- Terawaki, S. et al., 2007. Specific and high-affinity binding of tetramerized PD-L1 extracellular domain to PD-1-expressing cells: possible application to enhance T cell function. *Int Immunol*, 19(7): 881-90.
- Thompson, C.B. et al., 1989. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(4): 1333-7.
- Tivol, E.A. et al., 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3(5): 541-7.
- Tompkins, S.M. et al., 2002. De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 168(8): 4173-83.
- Traver, D. et al., 2000. Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science*, 290(5499): 2152-4.

- Trinchieri, G., 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, 13: 251-76.
- Tseng, S.Y. et al., 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med*, 193(7): 839-46.
- Vanderlugt, C.L. et al., 1998. The functional significance of epitope spreading and its regulation by co-stimulatory molecules. *Immunol Rev*, 164: 63-72.
- Vanderlugt, C.L. and Miller, S.D., 2002. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2(2): 85-95.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M. and Stockinger, B., 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2): 179-89.
- Viola, A. and Lanzavecchia, A., 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*, 273(5271): 104-6.
- Walunas, T.L., Bakker, C.Y. and Bluestone, J.A., 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med*, 183(6): 2541-50.
- Walunas, T.L. et al., 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1(5): 405-13.
- Wang, L. et al., 2008. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(27): 9331-6.
- Wang, S. et al., 2003. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med*, 197(9): 1083-91.
- Watanabe, N. et al., 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol*, 4(7): 670-9.
- Waterhouse, P. et al., 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science*, 270(5238): 985-8.
- Weiner, H.L., 2001. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect*, 3(11): 947-54.
- Weir, C.R., Nicolson, K. and Backstrom, B.T., 2002. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in naive mice by dendritic cells presenting a self-peptide. *Immunol Cell Biol*, 80(1): 14-20.
- Whartenby, K.A. et al., 2005. Inhibition of FLT3 signaling targets DCs to ameliorate autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(46): 16741-6.

- Wiendl, H. et al., 2003a. Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *Faseb J*, 17(13): 1892-4.
- Wiendl, H. et al., 2003b. The CD28 related molecule ICOS: T cell modulation in the presence and absence of B7.1/2 and regulational expression in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 140(1-2): 177-87.
- Wiethe, C. et al., 2007. Interdependency of MHC class II/self-peptide and CD1d/self-glycolipid presentation by TNF-matured dendritic cells for protection from autoimmunity. *J Immunol*, 178(8): 4908-16.
- Willenborg, D.O., Fordham, S., Bernard, C.C., Cowden, W.B. and Ramshaw, I.A., 1996. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 157(8): 3223-7.
- Wintterle, S. et al., 2003. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res*, 63(21): 7462-7.
- Yamazaki, T. et al., 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol*, 169(10): 5538-45.
- Yoshinaga, S.K. et al., 1999. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*, 402(6763): 827-32.
- Yu, M., Johnson, J.M. and Tuohy, V.K., 1996. A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med*, 183(4): 1777-88.
- Zal, T., Volkman, A. and Stockinger, B., 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med*, 180(6): 2089-99.
- Zamvil, S.S. and Steinman, L., 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol*, 8: 579-621.
- Zang, X. et al., 2003. B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(18): 10388-92.
- Zhang, G.X. et al., 2003. Role of IL-12 receptor beta 1 in regulation of T cell response by APC in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 171(9): 4485-92.
- Zhang, X. et al., 2004. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity*, 20(3): 337-47.

- Zhu, B. et al., 2006. Differential role of programmed death-ligand 1 [corrected] and programmed death-ligand 2 [corrected] in regulating the susceptibility and chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 176(6): 3480-9.
- Zozulya, A.L. et al., 2009. Intracerebral dendritic cells critically modulate encephalitogenic versus regulatory immune responses in the CNS. *J Neurosci*, 29(1): 140-52.
- Zozulya, A.L. and Wiendl, H., 2008. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol*, 4(7): 384-98.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CBA	„cytokine bead array“
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	„Cluster of differentiation“
CFA	Komplettes Freund´s Adjuvans
cpm	„Counts per minute“
DMEM	“Dulbecco´s Modified Eagle Medium”
DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	„Enzyme-linked immunoabsorbent Assay“
ELISPOT	„Enzyme-linked immuno spot Technique“
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead box P3
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
h	Stunde
i.v.	intravenös
i.z.	intrazerebral
ICCS	Intrazelluläre Zytokinfärbung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT	„immunoglobulin-like transcript“
LN	Lymphknoten

LPS	Lipopolysaccharid
MACS	„magnetic bead-activated cell sorting“
MBP	Myelinbasisches Protein
MHC	„major histocompatibility complex“
min	Minute
MOG	Myelinoligodendrozytenprotein
MS	Multiple Sklerose
NKT	Natürliche Killer (T)-Zelle
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphatpuffer
PE	Phycoerythrin
PerCP	Perinidin-Chlorophyll-Protein
PIR	„paired immunoglobulin-like receptor“
PLP	Proteolipid-Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SC	Standardmedium
Tab.	Tabelle
TGF	„Transforming growth-factor“
Th	T-Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor
Tr1	Adaptive regulatorische T-Zelle
Treg	Regulatorische T-Zelle
TUNEL	“Terminal transferase dUTP nick end labeling”
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Einheiten
vs.	versus
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

8.2 Publikationen

8.2.1 Originalarbeiten

Expression of CD28-related costimulatory molecule and its ligand in inflammatory neuropathies

Hu W, Janke A, **Ortler S**, Hartung HP, Leder C, Kieseier BC, Wiendl H
Neurology 2007;68:277-282

Modulation of T-effector function by imatinib at the level of cytokine secretion

Leder C, **Ortler S**, Seggewiss R, Einsele H, Wiendl H
Experimental Hematology 2007 Aug; 35(8):1266-71

B7-H1 restricts Neuroantigen-specific T cell responses and confines inflammatory CNS damage: Implications for the lesion pathogenesis of multiple sclerosis

Ortler S, Leder C, Mittelbronn MM, Zozulya AL, Knolle P, Chen L, Kroner A, Wiendl H
European Journal of Immunology 2008 Jun; 38(6):1734-44

Intracerebral dendritic cells critically modulate encephalitogenic versus regulatory immune responses

Zozulya AL, **Ortler S**, Lee JE, Weidenfeller C, Sandor M, Wiendl H and Fabry Z
Journal of Neuroscience 2009 Jan; 29(1):140-152

The level of B7-H1 expression on brain dendritic cells is decisive for CD8 regulatory T cell recruitment into the CNS during EAE

Zozulya AL*, **Ortler S***, Fabry Z, Sandor M and Wiendl H
*In Revision, * gleichberechtigte Erstautorenschaft*

Accelerated course of experimental autoimmune encephalomyelitis in PDI-deficient CNS myelin mutants

Kroner A, Schwab N, Ip CW, **Ortler S**, Goebel K, Nave KA, Mäurer M, Martini R and Wiendl H

In Revision

B7-H1 on dendritic cells regulates tolerance induction in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through CD1d-restricted CD4⁺ T cells

Geus C*, **Ortler S***, Lutz MB and Wiendl H

*Eingereicht, * gleichberechtigte Erstautorenschaft*

8.2.2 Tagungsbeiträge

37th Annual Meeting of the German Society of Immunology, Heidelberg, Deutschland (5.-8. September 2007): *B7-H1 modulates neuro-antigen specific T cell responses and confines CNS damage*

Ortler S, Leder C, Mittelbronn MM, Zozulya AL, Knolle P, Chen L, Kroner A, Wiendl H

23rd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Prag, Tschechien (11.-14. Oktober 2007): *B7-H1 modulates neuro-antigen specific T cell responses and confines CNS damage*

Ortler S, Leder C, Mittelbronn MM, Zozulya AL, Knolle P, Chen L, Kroner A, Wiendl H

4th Spring School on Immunology, Ettal, Deutschland (2.-7. März 2008): *Induction of Tolerance by TNF-matured Wildtype and PD-L1^{-/-} Dendritic Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*

Geus C, **Ortler S**, Wiendl H, Lutz MB

Joint Annual Meeting of Immunology, Wien, Österreich (3.-6. September 2008): *Induction of Tolerance by TNF-matured Wildtype and PD-L1^{-/-} Dendritic Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*

Geus C, **Ortler S**, Wiendl H, Lutz MB

9th International Congress of Neuroimmunology, Fort Worth, Texas, USA (26.-30. Oktober 2008): *Intracerebral dendritic cells critically modulate encephalitogenic versus regulatory immune responses*

Zozulya AL, **Ortler S**, Lee JE, Weidenfeller C, Sandor M, Wiendl H and Fabry Z

France-German Meeting on Multiple Sclerosis, Paris, Frankreich (6. März 2009): *Intracerebral dendritic cells critically modulate encephalitogenic versus regulatory immune responses*

Ortler S, Zozulya AL, Lee JE, Weidenfeller C, Sandor M, Wiendl H and Fabry Z

8.3 Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Freunde und Kollegen beigetragen. Ich möchte allen ganz herzlich danken, die mich während der letzten Jahre unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich

- bei Prof. Dr. K. V. Toyka für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation in den Laboren und Räumlichkeiten der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg.
- bei Prof. Dr. H. Wiendl, der mich durch alle Phasen dieser Dissertation betreut, unterstützt und gefördert hat. Vielen Dank für die Überlassung dieses äußerst interessanten und vielschichtigen Themas, die fachlichen Ratschläge und den Freiraum bei der experimentellen Arbeit.
- bei Prof. Dr. W. Rössler, der ohne zu zögern die Betreuung dieser Arbeit seitens der Fakultät für Biologie übernahm.
- bei der ganzen Flachbaubelegschaft für die vielen lustigen und emotionalen Momente der letzten Jahre, die hilfsbereite und kollegiale Arbeitsweise und den immer gut besetzten Aufenthaltsraum, in dem man seinen Kaffee nie alleine trinken musste. Namentlich danke ich Babsi Reuter und Theresa Moritz, die mir vor allem in der Schlussphase dieser Arbeit bei großen Experimenten geholfen und mich unterstützt haben. Babs Wrobel danke ich für die regelmäßige Begleitung zum Mittagessen und die beste freundschaftliche Zusammenarbeit, die man sich wünschen kann – auch außerhalb des Labors.
- bei Dr. Christoph Leder für seine kompetente Anleitung und Betreuung besonders während der Anfangsphase. Er hat durch zahlreiche Ideen, Ratschläge und Hilfestellungen einen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit und war mir nicht zuletzt aufgrund seiner wissenschaftlichen Sorgfalt ein wertvoller Ansprechpartner. Gleiches gilt für Dr. Antje Kroner-Milsch, von der ich besonders in tierexperimentellen und histologischen Belangen viel Neues lernen durfte. Ebenfalls bin ich Dr. Alla Zozulya zu großem Dank verpflichtet, die mich bereitwillig in ihre Projekte eingebunden und stets mit Rat und Tat unterstützt hat.
- bei meinen Mitdoktoranden Yu-Hwa Huang und Nicholas Schwab für ihre Bereitschaft, mit mir 1919 und damit die Herausforderungen des Alltags zu teilen.

-
- bei Carolin Geus und Prof. Manfred Lutz aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie für die erfolgreiche Zusammenarbeit.
 - bei Frau Helga Brünner und dem Tierpflegerteam für die gute Betreuung und Versorgung diverser Mäuse, ohne die kein Experiment gelaufen wäre.
 - bei meiner Familie, meinen Eltern und meiner Schwester Silke, die stets hinter mir stehen: sie haben mich in den letzten Jahren bedingungslos unterstützt und ermutigt, diesen Weg zu gehen.
 - bei Thomas für seine liebevolle Unterstützung und die gemeinsame Zeit in Würzburg.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Sonja Ortler

Steinheilstr. 51

97080 Würzburg

sonja.ortler@web.de

geboren am 07.12.1980 in Ingolstadt

ledig

Schul- und Hochschulbildung

09/1991 – 06/2000	Katharinen-Gymnasium, Ingolstadt
07/2000	Allgemeine Hochschulreife
10/2000 – 06/2005	Studium der Biologie (Diplom) an der Technischen Universität München (TUM), Freising-Weihenstephan Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Botanik, Medizinische Virologie
08/2002	Vordiplom
09/2004 – 06/2005	Diplomarbeit an der GSF - Institut für Molekulare Virologie, Abteilung Virale Vektoren, München (Dr. Drexler): „Generierung und funktionelle <i>in vitro</i> Charakterisierung rekombinanter MVA Viren zur Expression von Wildtyp bzw. Mutanten des Tumorantigens TRP-2 unter Kontrolle des natürlichen P7.5 Promotors“
06/2005	Diplom, Studiumsabschluss als Dipl. Biologin Univ.

Promotion

Seit 08/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Neurologischen Klinik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg Klinische Forschungsgruppe für Multiple Sklerose und Neuroimmunologie (Prof. Wiendl): „Die Bedeutung koinhibitorischer Signale in der ZNS Immunregulation: Die Rolle des B7-Homologs B7-H1 (PD-L1)“
--------------	---