



Expression und Bedeutung von IFN beta in Mausmodellen
für
Multiple Sklerose und Polymikrobielle Peritonitis

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Magdalena Julia Kocur
aus Kattowitz/Polen

Düsseldorf, November 2012

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin : Frau Prof. Dr. Stefanie Scheu
Koreferent: Herr Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2012

In vivo veritas.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Zusammenfassung	X
Summary	XI
1. Einleitung.....	1
1.1 Überblick über das Immunsystem	1
1.2 Lymphatische Organe	2
1.3 Immunantworten im Zentralen Nervensystem	3
1.4 Dendritische Zellen	5
1.5 Mikroglia.....	6
1.6 Pattern recognition receptors.....	7
1.6.1 Toll-like Rezeptoren	7
1.6.2 RIG-I ähnliche Rezeptoren	9
1.7 Zytokine.....	10
1.7.1 Typ I Interferone	10
1.7.1.2 Induktion der IFN β Transkription.....	12
1.7.2 Die IL-12 Zytokin-Familie	12
1.8 Multiple Sklerose	14
1.8.1 Klinischer Verlauf und Therapie der Multiplen Sklerose	15
1.8.2 Therapie der Multiplen Sklerose mit Interferonen.....	16
1.8.3 Tiermodelle der Multiplen Sklerose	17
1.9 Sepsis.....	21
1.9.1 Immunologische Grundlagen der Sepsis	22
1.9.2 Tiermodelle der Sepsis.....	24
1.9.3 Virusinfektion, Typ I IFN und polymikrobielle Peritonitis.....	26
1.10 Zielsetzung der Arbeit.....	27

2. Ergebnisse	28
2.1 Untersuchung der IFN β Expression in einem Modell für Multiple Sklerose	28
2.1.1 <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Analyse der IFN β produzierenden Zellen während der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis	28
2.1.1.1 Definition der intrazerebralen Zellpopulationen.....	29
2.1.1.2 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression auf Einzel-Zellebene in der Peripherie am Höhepunkt der Krankheit.....	30
2.1.1.3 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression auf Einzelzellebene im ZNS am Höhepunkt der Krankheit.....	31
2.1.1.4 Analyse der IFN β -mRNS in sortierten Zellpopulationen des ZNS am Höhepunkt der Krankheit.....	33
2.1.1.5 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression von Mikroglia aus EAE-induzierten Mäusen nach Stimulation mit definierten PAMPs	34
2.1.2 Charakterisierung der Immunantwort in der Peripherie und im ZNS im Verlauf der EAE.....	35
2.1.2.1 Vergleich der IFN β mRNS Expression zwischen Peripherie und ZNS im Verlauf der EAE	35
2.1.2.2 Korrelation der IFN β mRNS Expression mit der Expression des Interferon stimulierten Gens ISG56.....	37
2.1.2.3 Charakterisierung der Immunantwort in der Peripherie im Verlauf der EAE ..	38
2.1.2.4 Charakterisierung der Immunantwort im ZNS im Verlauf der EAE	40
2.1.3 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression im ZNS nach Stimulation mit definierten PAMPs <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	42
2.1.3.1 Charakterisierung der IFN β /YFP Produzenten im ZNS nach <i>ex vivo</i> Stimulation mit PAMPs	43
2.3.2 Charakterisierung und Lokalisierung der IFN β /YFP Expression nach intrathekaler polyI:C Stimulation.....	44
2.3.3 Etablierung einer primären Mikroglia-Kultur aus der adulten Maus	46
2.2 Untersuchung der IFN β Expression und seiner Bedeutung in der Polymikrobiellen Peritonitis im Kontext einer viralen Infektion.....	49
2.2.1 Untersuchung der Auswirkungen einer akuten Virusinfektion auf den Verlauf einer polymikrobiellen Peritonitis	49
2.2.1.1 Relevanz der IFN β und IFNAR Expression für das Überleben nach CASP-OP im Verlauf einer akuten Virusinfektion.....	50
2.2.1.2 Einfluss von IFN β und des IFNARI auf die bakterielle Last im Verlauf einer akuten Virusinfektion.....	52
2.2.1.3 Einfluss einer viral induzierten Typ I IFN Antwort auf die zelluläre Zusammensetzung in der Peritonealhöhle	54
2.2.1.4 Einfluss einer viral induzierten Typ I IFN Antwort auf die Zytokinsekretion während der CASP.....	56
2.2.2 <i>In vivo</i> Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression	59
2.2.2.1 <i>In vivo</i> Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in naiven Doppelreporter-Mäusen	59

2.2.2.2 <i>In vivo</i> Charakterisierung der IFN β /YFP und IL-12p40/GFP Produzenten während der CASP und nach polyI:C Vorstimulation in der Milz und der Peritonealhöhle	61
2.2.2.3 <i>In vivo</i> Charakterisierung und Lokalisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten nach polyI:C Stimulation.....	66
2.2.2.4 <i>In vivo</i> Charakterisierung und Lokalisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten nach CpG Stimulation	69
2.2.2.5 Quantifizierung der <i>in vivo</i> Expression von IL-12p40/GFP und IFN β /YFP der Milz	72
2.2.3 <i>In Vitro</i> Charakterisierung der IL12p40/GFP und IFN β /YFP Expression	74
2.2.3.1 <i>In vitro</i> Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression nach Stimulation mit definierten PAMPs	74
2.2.3.2 Funktionelle Analyse sortierter GM-CSF DCs basierend auf ihrer Reporterallel-Expression	76
2.2.3.3 <i>In vitro</i> Restimulation sortierter IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Zellpopulationen mit definierten PAMPs.....	78
2.2.3.4 <i>In vivo</i> Restimulation sortierter IL-12p40/GFP ⁺ und IFN β /YFP ⁺ Zellpopulationen durch CASP	80
3. Diskussion.....	83
3.1 Untersuchung der IFN β Expression in einem Autoimmun-Modell	83
3.1.1 <i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Analyse der IFN β produzierenden Zellen in der EAE	83
3.1.2 Vergleich der IFN β mRNS Expression zwischen Peripherie und ZNS im Verlauf der EAE.....	85
3.1.3 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression im ZNS nach Stimulation mit definierten PAMPs <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	87
3.2 Untersuchung der IFN β Expression in der Polymikrobiellen Peritonitis und seiner Bedeutung in der Polymikrobiellen Peritonitis im Kontext einer viralen Infektion	90
3.2.1 Relevanz der IFN β Expression für eine Interferon-induzierte Hypersensitivität gegenüber einer Polymikrobiellen Peritonitis.....	91
3.2.2 Charakterisierung der IFN β und IL-12p40 produzierenden Zellen in der CASP	94
3.2.3 <i>In vitro</i> Charakterisierung der IFN β /YFP und IL-12p40/GFP Expression	98
3.3 Ausblick	101
4. Material und Methoden	103
4.1 Bezugsquellen.....	103
4.1.1 Chemikalien.....	103
4.1.2 Enzyme.....	104
4.1.3 Narkotika.....	104
4.1.4 Kits und andere Reagenzien	104
4.1.5 TLR-Agonisten	105

4.1.6 Verbrauchsmaterial	105
4.1.7 Geräte	105
4.2 Medien, Zelllinien und Puffer.....	106
4.2.1 Zellkulturmedien.....	106
4.2.2 Zelllinien und Zellen	107
4.2.3 Puffer.....	107
4.3 Oligonukleotide und Antikörper	108
4.3.1 Oligonukleotide.....	108
4.3.2 Antikörper	109
4.4 Tierversuche	109
4.4.1 Versuchstiere	109
4.4.1.1 Das IFN β Reportermausmodell.....	110
4.4.1.2 Das IL-12p40 x IFN β Doppel-Reportermausmodell	110
4.4.2 Methoden der EAE.....	111
4.4.2.1 Induktion der EAE	111
4.4.2.2 Herstellung des Inokulums	112
4.4.2.3 Klinische Evaluation des Krankheitsverlaufs.....	112
4.4.2.4 Präparation von Milz und Lymphknoten	112
4.4.2.5 Perfusion und Entnahme von Rückenmark und Gehirn	113
4.4.2.6 Intrathekale Stimulation mit PAMPs	113
4.4.2.7 Isolation mononukleärer Zellen aus dem ZNS.....	113
4.4.2.8 Re/Stimulation von intazerebralen Leukozyten	114
4.4.3 Methoden der CASP.....	114
4.4.3.1 Colon ascendens Stent Peritonitis	114
4.4.3.2 Überlebenskinetik.....	115
4.4.3.3 Entnahme der Peritoneallavage	115
4.4.3.4 Blutentnahme	115
4.4.3.5 Bestimmung der Bakterienlast im Peritoneum und der Milz.....	116
4.4.3.6 <i>In vivo</i> TLR Agonist Stimulation.....	116
4.4.3.7 Präparation von Knochenmarkszellen	116
4.4.3.8 <i>In vivo</i> Restimulation von sortierten GM-CSF DCs.....	117
4.5 Molekularbiologische Methoden	117
4.5.1 Isolation von RNS aus Gewebe	117
4.5.2 Reverse Transkription	117
4.5.3 Quantitative Real Time PCR	118
4.6 Zellbiologische Methoden	119
4.6.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	119
4.6.2 Kryokonservierung und Lagerung eukaryotischer Zellen	119
4.6.3 Generierung und Austestung von GM-CSF-haltigem Überstand	119
4.6.4 Generierung von GM-CSF DCs	119

4.6.5 Generierung von adulter Mikroglia	120
4.6.7 Stimulation von <i>in vitro</i> generierten myeloiden Zellen	120
4.6.8 <i>In vitro</i> Restimulation von sortierten GM-CSF DCs.....	120
4.6.9 T Zell Proliferationsassay	121
4.7 Immunologische Methoden.....	121
4.7.1 ELISA.....	121
4.7.2 Immunhistologie	121
4.7.3 Durchflusszytometrie.....	122
4.7.4 Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmarkern	123
4.7.5 Zellsortierung	123
4.7.6 Analyse und Darstellung von FACS-Daten	123
5. Literaturverzeichnis.....	125
6. Anhang	144
6.1 Danksagung	144
6.2 Eidesstattliche Erklärung	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Kooperation des angeborenen und adaptiven Immunsystems.	2
Abbildung 1.2 Anatomie der Milz	3
Abbildung 1.3 Die Blut-Hirn-Schranke.	4
Abbildung 1.4 Funktionelles Modell muriner DC Subpopulationen.	5
Abbildung 1.5 Das TLR-System.	8
Abbildung 1.6 RIG-I ähnliche Rezeptoren und ihre Aktivierung.	9
Abbildung 1.7 Produktion und Signalweg von Typ I Interferonen.	11
Abbildung 1.8 Biologische Funktionen von IL-12.	13
Abbildung 1.9 Zielantigene der weißen Substanz in der MS.	18
Abbildung 1.10 Pathogenese der EAE.	20
Abbildung 1.11 Pathogenetisches Netzwerk des Schocks.	23
Abbildung 1.12 Schematische Darstellung der CASP-OP.	25
Abbildung 2.1 Definition der Phasen der EAE.	28
Abbildung 2.2 Einteilung der Zellpopulationen im ZNS.	29
Abbildung 2.3 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression in der Milz und peripheren Lymphknoten am Höhepunkt der Krankheit.	30
Abbildung 2.4 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression im ZNS am Höhepunkt der Krankheit.	32
Abbildung 2.5 Analyse der IFN β mRNA-Expression in intrazerebralen Zellpopulationen am Höhepunkt der Krankheit.	33
Abbildung 2.6 IFN β /YFP-Expression in <i>ex vivo</i> stimulierten intrazerebralen Leukozyten am Höhepunkt der Krankheit.	34
Abbildung 2.7 Vergleich der IFN β mRNA-Expression zwischen sekundären lymphatischen Organen und ZNS.	36
Abbildung 2.8 Analyse der ISG56 mRNA Expression im Verlauf der EAE	37
Abbildung 2.9 Charakterisierung der Immunantwort in der Milz im Verlauf der EAE.	39
Abbildung 2.10 Charakterisierung der Immunantwort im Rückenmark im Verlauf der EAE.	41
Abbildung 2.11 IFN β /YFP-Expression in naiven <i>ex vivo</i> stimulierten intrazerebralen Zellpopulationen 24 h nach Stimulation.	43
Abbildung 2.12 IFN β /YFP-Expression 24 h nach intrathekaler polyI:C Stimulation in intrazerebralen Zellpopulationen des Gehirns.	44
Abbildung 2.13 Lokalisation der IFN β /YFP exprimierenden Zellen nach intrathekaler polyI:C Stimulation.	45
Abbildung 2.14 IFN β /YFP Expression in adulter Mikroglia nach Stimulation mit definierten PAMPs.	47
Abbildung 2.15 Relevanz von IFN β und des IFNAR für das Überleben nach CASP-OP im Kontext einer viralen Infektion.	51
Abbildung 2.16 Einfluss von IFN β und des IFNAR auf die bakterielle Last der Peritonealhöhle und der Milz nach CASP-OP im Kontext einer viralen Infektion.	53
Abbildung 2.17 Einfluss von IFN β und des IFNAR auf die zelluläre Komposition der Peritonealhöhle nach CASP-OP im Kontext einer viralen Infektion.	55
Abbildung 2.18 Abhängigkeit der <i>in vivo</i> Zytokinsekretion von IFN β und des IFNAR nach CASP-OP im Verlauf einer viralen Infektion.	58

Abbildung 2.19 Gating Strategie für <i>in vivo</i> Analysen der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression.	59
Abbildung 2.20 <i>In vivo</i> Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in der Milz von naiven IL-12p40 ^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} Doppel-Reporter-mäusen.....	60
Abbildung 2.21 Analyse der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten in der Peritonealhöhle nach CASP-OP.....	62
Abbildung 2.22 Analyse der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten in der Milz nach CASP-OP.	64
Abbildung 2.23 Quantifizierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten nach CASP-OP.	66
Abbildung 2.24 <i>In vivo</i> Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in der Milz nach polyI:C Stimulation.	67
Abbildung 2.25 Lokalisierung der IL-12p40/GFP ⁺ , IL-12p40 ⁺ und IFN β /YFP ⁺ Zellen in der Milz nach polyI:C Injektion.....	68
Abbildung 2.26 <i>In vivo</i> Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in der Milz nach CpG2216 Stimulation.	70
Abbildung 2.27 Lokalisierung der IL-12p40/GFP ⁺ , IL-12p40 ⁺ und IFN β /YFP ⁺ Zellen in der Milz nach CpG2216 Injektion.	71
Abbildung 2.28 Quantifizierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in der Milz.	73
Abbildung 2.29 <i>In vitro</i> Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in GM-CSF DCs nach Stimulation mit PAMPs.....	75
Abbildung 2.30 Untersuchung der Funktionalität der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP produzierenden GM-CSF DCs.....	77
Abbildung 2.31 Untersuchung der Plastizität der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression nach Vorstimulation mit PAMPs.	79
Abbildung 2.32 <i>In vivo</i> Restimulation von transferierten IL-12p40/GFP und IFN β /YFP exprimierenden GM-CSF DCs.....	81
Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des bicistronischen IFN β ^{mob/mob} Reporter-Mausmodells.	110
Abbildung 4.2 Schematische Darstellung des bicistronischen IL-12p40 ^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} Reporter Mausmodells.....	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1 Zellkulturmedien.....	106
Tabelle 4.2 Zelllinien und Zellen.....	107
Tabelle 4.3 Puffer	107
Tabelle 4.4 Primer	108
Tabelle 4.5 Antikörper.....	109
Tabelle 4.6 Versuchstiere	109
Tabelle 4.7 Klassifizierung des Krankheitsverlaufs.....	112
Tabelle 4.8 <i>In vivo</i> TLR Stimulation	116
Tabelle 4.9 <i>In vitro</i> TLR Stimulation.....	120

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	Lgp2	Laboratory of Genetics and Physiology
APZ	antigenpräsentierende Zelle	LRR	Leucin reiche Region
BHS	Blut-Hirn Schranke	M	Molar
bzw.	beziehungsweise	MΦ	Makrophage
CARD	caspase activation and recruitment domain	MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome	MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5
CD	Cluster of Differentiation	MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
cDC	konventionelle Dendritische Zelle	MZ	Marginalzone
cDNS	komplementäre DNS	NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
CFA	komplettes Freundesches Adjuvants	NMDA	N-Methyl D-aspartic acid
CFU	colony forming units	ODN	Oligidinukleotide
Cy	Cyanin	OVA	Ovalbumin
d	Tag	PALS	periarteriöle lymphatische Scheide
DAPI	4'-6'-Diamin-2-phenylindol	PAMP	pathogen associated molecular pattern
DC	dendritische Zelle	PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PCR	Polymerase Kettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	pDC	plasmazytoide Dendritische Zelle
DNS	Desoxyribonukleinsäure	PE	Phycoerythrin
dNTP	Desoxyribonukleotide	PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein complex
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfate	PFA	Paraformaldehyd
ds	doppelsträngig	PLP	Proteolipid Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	polyI:C	polyribinosinsäure-Polyribocytidylsäure
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent Assay	PRR	pattern recognition receptor
EtOH	Ethanol	PTX	Pertussis Toxin
etc.	et cetera	qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion
FACS	fluorescent activated cell sorting	RIG-I	retinoic acid inducible gene I
FCS	Fötales Kälberserum	RNS	Ribonukleinsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	rpm	Umdrehungen pro Minute
GAS	interferon gamma-activated sequence	RT	Raumtemperatur
GFP	grün fluoreszierendes Protein	s.	siehe
GIPL	Glykoinositolphospholipid	SA	Streptavidin
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor	SIRS	systemisches inflammatorisches Response Syndrom
h	Stunden	ss	einzelsträngig
H ₂ O	Wasser	STAT	signal transducer and activator of transcription
IDO	Indolamin 2,3 Dioxygenase	TIR	Toll/Interleukin-1 receptor
IFN	Interferon	TLR	Toll like Rezeptor
IFNAR	Typ I Interferon Rezeptor	TNF	Tumornekrosefaktor
IL	Interleukin	TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
iNOS	induzierbare Stickstoff-monoxid Synthase	Tyk2	Tyrosin Kinase 2
int	intermediary	u. a.	unter anderem
i.p.	intraperitoneal	v/v	Volumen/Volumen
IPS1	interferon-beta promoter stimulator	w/v	Gewicht/Volumen
IRF	interferon regulatory factor	YFP	gelb fluoreszierendes protein
Jak	Janus Kinase	ZNS	Zentrales Nervensystem
LPS	Lipopolysaccherid		

Zusammenfassung

IFN β gehört zur Familie der Typ I IFN. Durch ihre pleiotropen, immunregulatorischen Wirkmechanismen vermitteln sie sowohl in der Abwehr verschiedenster Pathogene, als auch in der Autoimmunität positive, wie auch negative Effekte. IFN β vermittelt in der EAE eine protektive Wirkung und trägt zu einem milderen Verlauf der Krankheit bei, während es in anderen Autoimmun-Modellen wie dem systemischen Lupus erythematosus einen nachteiligen Effekt auf die Pathogenese ausübt. Zu Beginn einer Virusinfektion wird IFN β ebenfalls exprimiert, was zur Induktion des antiviralen Status führt und zur Klärung der Infektion. Im Gegensatz dazu vermittelt IFN β während bakterieller Infektionen, wie der Colon ascendens Stent Peritonitis, oft einen detrimentalen Effekt und wirkt sich negativ auf den Krankheitsverlauf aus. Die Beschreibung der immunmodulatorischen Kapazität von IFN β wurde aufgrund dieser vielfältigen Wirkungen bereits in vielen Krankheitsmodellen durchgeführt. Die Quelle der IFN β Produktion wurde auf Einzelzellebene bisher jedoch nur unzureichend charakterisiert. Daher wurden unter Zuhilfenahme des bicistronischen IFN β /YFP Reportermausmodells die IFN β Produzenten im Modell der EAE sowie der CASP charakterisiert.

In der EAE wurden am Höhepunkt der Krankheit Mikroglia als Hauptproduzenten von IFN β /YFP identifiziert. Die Analyse der IFN β mRNA Expression im Verlauf der EAE zeigte, in der Initiationsphase der Krankheit, eine frühe IFN β mRNA Expression in der Milz und den peripheren Lymphknoten. Die IFN β Expression im ZNS war hierzu gegenläufig reguliert und die IFN β Expression vor allem in der Effektorphase präsent. Die Analyse EAE-relevanter Gene definierte die Bedingungen unter denen IFN β exprimiert wurde. Die intrathekale und *in vitro* TLR Stimulation im naiven Zustand konnte zeigen, dass Mikroglia auch unter diesen Bedingungen IFN β /YFP exprimieren und einen wichtigen Beitrag zur Modulation von Immunantworten leisten. Die Etablierung einer primären Mikrogliaultur aus adulten Mäusen ermöglicht hierbei die weitere funktionelle Analyse der IFN β /YFP⁺ Mikroglia.

Im Modell der CASP wurde zunächst der Einfluss einer viral vermittelten Typ I IFN Antwort auf den Verlauf der Krankheit untersucht. Hierzu wurden Überleben, Bakterienlast, zelluläre Komposition der Peritonealhöhle und die Zytokinproduktion in wt, IFN β ^{-/-} und IFNARI^{-/-} Mäusen verglichen. In Abwesenheit von IFN β kam es zu einem geringfügig milderen Verlauf der polymikrobiellen Peritonitis. IFNARI^{-/-} Mäuse wiesen jedoch signifikant verbesserte Werte gegenüber wt und IFN β ^{-/-} Tieren auf, so dass die Wirkung von IFN β in diesem Kontext als weitestgehend redundant definiert wurde. Die Analyse der IFN β /YFP und IL-12p40/GFP Expression konnte cDCs als Hauptproduzenten während der CASP und nach polyI:C Stimulation identifizieren. Die *in vivo* Analyse und die nachfolgende *in vitro* Analyse von GM-CSF DCs zeigte ein differentielles Expressionsmuster beider Zytokine, mit einer meist exklusiven Expression der Reporterallele, während nur wenige Zellen IL-12p40/GFP und IFN β /YFP simultan exprimierten. Die durch die Reporterallel-Expression definierten DC Subpopulationen wiesen zusätzlich funktionelle Unterschiede im Bezug auf die PRR Expression und die T Zell stimulatorische Kapazität auf. Schließlich konnte die IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression auf Einzelzellebene nach polyI:C Stimulation und *in vitro* sowie *in vivo* Restimulation verfolgt werden. Diese zeigte ein durch die Primärstimulation festgelegtes Expressionsprofil beider Zytokine, was *in vivo* möglicherweise zum detrimentalen Defekt der Immunantwort beiträgt, die nicht optimal auf die Sekundärinfektion reagiert und zu einer Immunpathologie führt.

Summary

IFN β belongs to the family of Type I IFNs, which have pleiotropic immunoregulatory functions and mediate positive as well as negative effects during immune responses to multiple pathogens and autoimmunity. On the one hand IFN β plays a protective role in EAE and contributes to a better outcome, on the other hand in other autoimmune disorders like systemic lupus erythematosus it acts in a negative way. At the onset of a viral infection IFN β is also expressed and induces the antiviral state and induces antiviral immune responses which leads to clearance of infection. In contrast IFN β often adversely affects the course of bacterial infection like the colon ascendens stent peritonitis ending in a detrimental outcome. The characterization of the immunoregulatory capacity of IFN β was already carried out in many disease models, but the cellular source of IFN β was described insufficiently until now. Here a bicistronic reporter mouse model was used to phenotypically and functionally characterize the IFN β producing cells during EAE and CASP.

During EAE at the peak of disease microglia were identified as main producers of IFN β /YFP. The analysis of IFN β mRNA expression during the course of EAE showed in the initiation phase an early IFN β expression in the spleen and the peripheral lymphnodes. Compared to that IFN β was inversely expressed in the CNS where it was produced mainly in the effector phase of disease. Furthermore the analysis of EAE-relevant genes defined the environmental conditions during IFN β expression. The intrathecal and *in vitro* TLR stimulation of microglia in the naïve state also defined microglia as sole producers of IFN β /YFP under these conditions and showed their capacity to influence immune responses. The establishment of a primary microglia culture from adult mice enables further functional analysis of IFN β /YFP⁺ microglia.

In the CASP model the influence of a virus driven Type I IFN response on the disease outcome was analysed. Therefore, survival, bacterial load, cellular composition of peritoneal cavity and cytokine production were compared in wt, IFN β ^{-/-} and IFNARI^{-/-} mice. The absence of IFN β led to a slightly milder outcome of the CASP. IFNARI^{-/-} mice showed significantly improved survival in comparison to wt and IFN β ^{-/-} mice. Accordingly, the effect of IFN β during CASP was defined as mostly redundant. The analysis of the IFN β /YFP and IL-12p40/GFP during CASP and after TLR stimulation identified cDCs as main producers. *In vivo* as well as the following *in vitro* stimulation of GM-CSF DCs revealed a differential expression profile of both cytokines with nearly an exclusive expression of both reporter alleles, because only few cells expressed IL-12p40/GFP and IFN β /YFP simultaneously. The DC populations, which were defined by their reporter allele expression additionally showed functional differences in PRR expression and in their T cell stimulatory capacity. Finally the IL-12p40/GFP and IFN β /YFP expression was traced on single cell basis after polyI:C stimulation and *in vitro* as well as *in vivo* re-stimulation. The primary stimulation induced a fixed expression profile of both reporter alleles. *In vivo* this effect could contribute to a detrimental defect in immune responses, with an inability to generate an optimal response towards secondary infections leading to immune pathology.

1. Einleitung

1.1 Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein hochkomplexes System aus zellulären und löslichen Bestandteilen, die den Organismus vor Infektionen und entarteten Zellen schützen. Um die schnelle Abwehr einer großen Vielfalt von Pathogenen zu gewährleisten hat sich im Laufe der Evolution ein Netzwerk bestehend aus unterschiedlichen Komponenten herausgebildet. Diese Komponenten beinhalten Organe, Zellen und lösliche Mediatoren. Dazu zählen die primären lymphatischen Organe Knochenmark und Thymus, sowie die sekundären lymphatischen Organe Lymphknoten, Milz und die Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebe in Lunge und Darm, in denen die adaptive Immunantwort ausgelöst wird. Ergänzend dazu steht dem Organismus die angeborene Immunantwort zur Verfügung, die die erste Linie der Abwehr bildet. Beide Systeme sind eng miteinander verbunden und gewährleisten eine zuverlässige Beseitigung von Pathogenen und Tumorzellen.

Das angeborene Immunsystem ist bereits sehr früh in der Phylogenese entstanden. Die erste Abwehrfront wird von anatomischen und physikalischen Barrieren gebildet. Werden diese Barrieren durchbrochen, werden lösliche und zelluläre Bestandteile aktiviert. Die löslichen Mediatoren der angeborenen Immunantwort beinhalten antimikrobielle Peptide, das Komplementsystem sowie Zytokine. Antimikrobielle Peptide, wie die Defensine werden im Dünndarm und der Lunge sekretiert. Sie stellen kationische Peptide dar, die die Membranintegrität durch Insertion stören (Yang et al., 2002). Das Komplementsystem bestehend aus 20 bisher bekannten Proteinen, die von der Leber produziert werden, induziert die Lyse körperfremder Zellen. Interferone (IFN) und weitere Zytokine z.B. IL-12 werden während einer Immunantwort sehr früh produziert und sind für die Induktion weiterer Effektormechanismen unerlässlich. Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems zählen dendritische Zellen (DC), Makrophagen (MΦ), Monozyten, Granulozyten, Natürliche Killerzellen und Mastzellen. Die Aktivierung der angeborenen Immunantwort erfolgt durch keimbahnkodierte Rezeptoren, die pattern recognition receptors (PRRs), die verschiedene konservierte Muster von Mikroorganismen erkennen, die sogenannten pathogen associated molecular patterns (PAMPs) (Kawai and Akira, 2010). Die Bindung von PAMPs an die PR-Rezeptoren führt zur Aktivierung der Zelle und Freisetzung verschiedener proinflammatorischer und antimikrobieller Effektormoleküle, wodurch es zu einer Entzündung und Abtötung des Mikroorganismus kommt. MΦ und DCs fungieren zusätzlich als sogenannte antigenpräsentierende Zellen (APZ). Sie präsentieren in der Frühphase einer adaptiven Immunantwort degradiertes und prozessiertes Antigen an spezifische naive T Zellen des adaptiven Immunsystems über den major histocompatibility complex MHC Klasse I und II in sekundären lymphatischen Organen, was zur Aktivierung der T Zellen führt. Gleichzeitig muss die APZ ein sogenanntes kostimulatorisches Signal weitergeben, um eine vollständige Aktivierung der T Zelle zu induzieren (Sugamura et al., 2004).

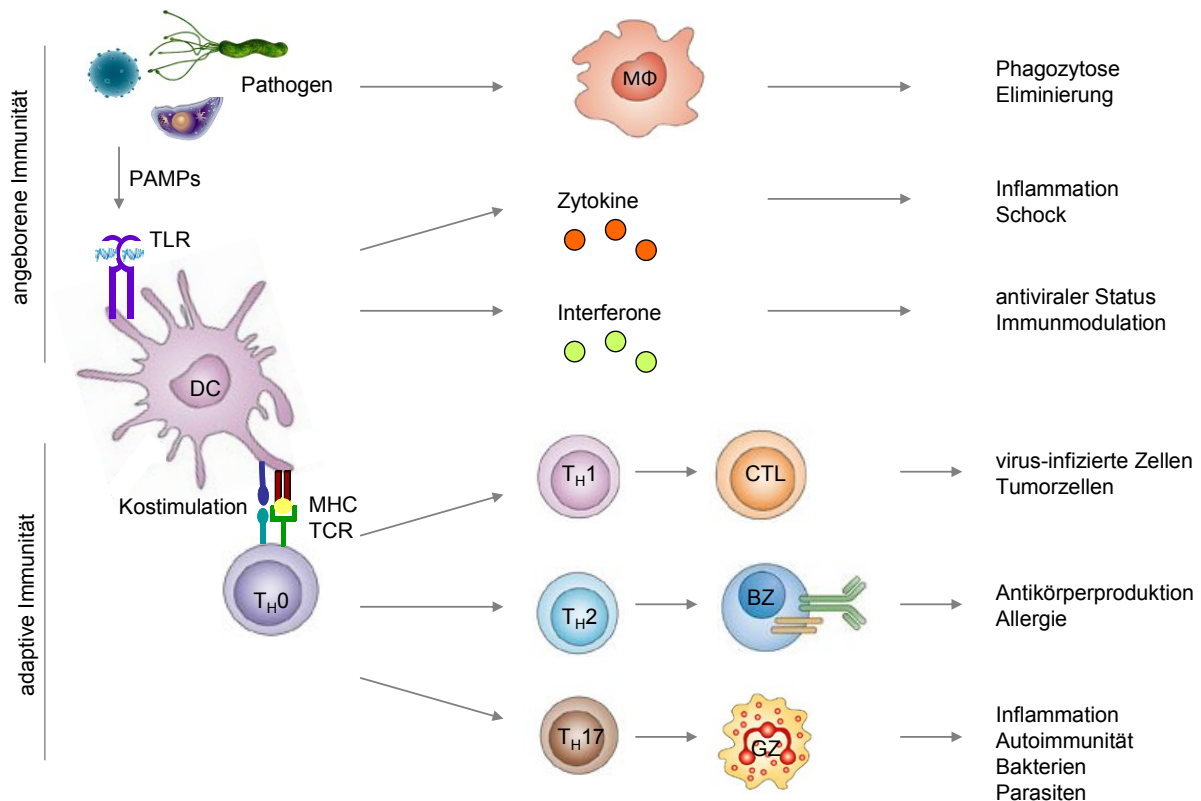


Abbildung 1.1 Kooperation des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

DCs des angeborenen Immunsystems werden durch PAMPs aktiviert. Durch Präsentation von Fremdantigenen im MHC-Kontext und gleichzeitiger Kostimulation werden naive T_H0 aktiviert und differenzieren in Abhängigkeit des umgebenden Zytokinmilieus zu unterschiedlichen T_{eff} heran, die zu einer spezifischen Immunantwort und in Kooperation mit den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems zur Elimination des Pathogens führen. Modifiziert nach (Riken Research, 17 August 2007 (Volume 2 Issue 8)) letzter Aufruf 13.11.2012.

Kostimulatorische Signale können sowohl durch Oberflächenmoleküle von APZs als auch durch sekretierte proinflammatorische Zytokine gegeben werden. Erst durch die Wechselwirkung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem kommt es zu einer vollständigen und erfolgreichen Immunabwehr (Janeway and Medzhitov, 2002).

1.2 Lymphatische Organe

Durch seine flächendeckende anatomische Lokalisation ist das Immunsystem in der Lage das Eindringen von Pathogenen schnell und effizient im gesamten Körper zu erkennen und zu beseitigen. Periphere Gewebe beherbergen DCs und MΦ, die in diesen ständig patrouillieren.

Die primären lymphatischen Organe, bestehend aus Knochenmark und Thymus, sind für die Neubildung von Lymphozyten verantwortlich. Im Knochenmark reifen hämatopoetische Vorläuferzellen zu funktionsfähigen B Zellen heran. Zusätzlich differenzieren hier auch die Vorläufer T Lymphozyten, die das Knochenmark verlassen, um im Thymus weiter heranzureifen. Nach Verlassen der primären lymphatischen Organe patrouillieren die Lymphozyten im lymphatischen System und den sekundären lymphatischen Organen, die die Milz, Lymphknoten, Mucosa-assoziiertes, Darm-assoziiertes und Bronchien-assoziiertes lymphatisches Gewebe beinhalten (MALT, GALT, BALT). Hier

treffen die Lymphozyten auf APZs, die nach spezifischer Erkennung zur Aktivierung der Lymphozyten führen.

Die Milz ist das größte sekundäre lymphatische Organ. Sie ist ausschließlich für die Überwachung des Blutes verantwortlich und wird funktionell und anatomisch in zwei unterschiedliche Bereiche unterteilt: die rote und die weiße Pulpa. Die rote Pulpa dient vor allem der Sequestrierung seneszenten Erythrozyten, apoptotischer Zellen und dem Recycling von Eisen, während die weiße Pulpa durch ihre besondere anatomische Organisation für die Induktion von Immunreaktionen gegen Pathogene im Blut verantwortlich ist. Die weiße Pulpa wird weiter in die innere T Zelle oder periarterielle lymphatische Scheide (PALS) und die äußere B Zell Zone unterteilt, die von der Marginalzone (MZ) umgeben wird (Cesta, Mebius kraal philipp). Die MZ beherbergt u.a. MZ-MΦ, die für die Phagozytose von Antigenen aus der Blutbahn verantwortlich sind (Aichele et al., 2003). Lymphozyten wie auch DCs und Granulozyten durchwandern die MZ, da der Blutfluss teilweise durch die MZ in die rote Pulpa fließt. Darüber hinaus treten DCs und Lymphozyten über den Marginalsinus in die weiße Pulpa ein (Mebius and Kraal, 2005).

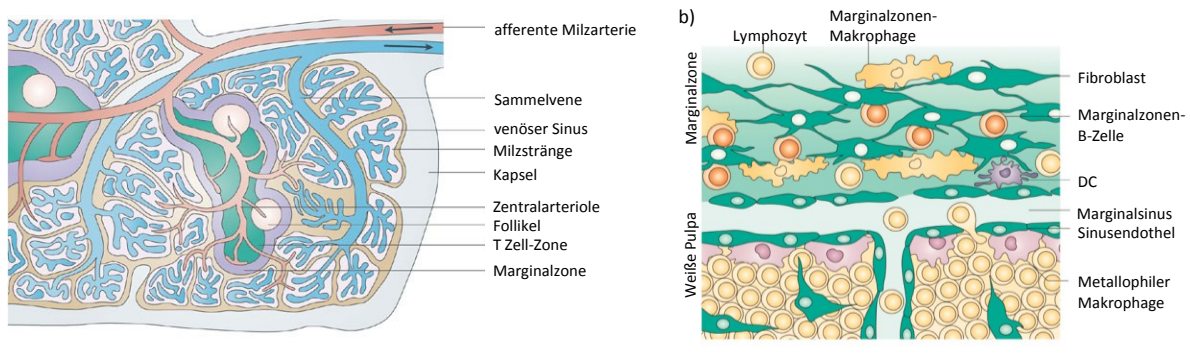


Abbildung 1.2 Anatomie der Milz

a) Die afferente Milzarterie verzweigt sich in die Zentralarteriolen, umgeben von der weißen Pulpa. Diese besteht aus der T Zell Zone, Arteriolen und B Zell Follikeln. Die Arteriolen enden in den Milzsträngen der roten Pulpa und fließen in die venösen Sinus der roten Pulpa, welche sich in der efferenten Milzvene sammeln. b) schematische Darstellung der Marginalzone. Residente Zellpopulationen sind Fibroblasten, metallophile Makrophagen und B Zellen. Immigrierende Zellen durchwandern die MZ in Richtung der weißen Pulpa. Modifiziert nach (Mebius and Kraal, 2005)

Lymphknoten liegen entlang der lymphatischen Gefäße, die die Extrazellulärflüssigkeit drainieren und überwachen. Sie induzieren Immunantworten gegen Fremdartigene, die aus unterschiedlichen Geweben des Organismus stammen und mit Hilfe der durch die Lymphe in die Lymphknoten transportierten APZs dort präsentiert werden (Itano and Jenkins, 2003).

1.3 Immunantworten im Zentralen Nervensystem

Das Zentrale Nervensystem (ZNS) galt lange als immunprivilegiertes Organ, das vom peripheren Immunsystem isoliert ist (Barker and Billingham, 1977). Immunprivilegierte Orte des Körpers sind in der Lage die Einbringung eines Antigens oder Gewebes über einen längeren Zeitraum zu tolerieren ohne eine inflammatorische Immunantwort zu induzieren (Carson et al., 2006; Medawar, 1948). Das Immunprivileg stellt eine evolutionäre Adaption dar, um bestimmte Organe vor den vermeintlichen

detrimentellen Effekten einer proinflammatorischen Immunantwort zu schützen. Das ZNS ist lebensnotwendig und besitzt nur eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit, weshalb ein immunprivilegiertes Status große Vorteile bieten würde. Diese Ansicht wurde jedoch widerlegt, als gezeigt werden konnte, dass im gesunden Gehirn T Zellen das ZNS patrouillieren ohne Immunantworten hervorzurufen (Hickey, 2001). Eine weitere Interaktion des ZNS mit dem peripheren Immunsystem besteht darin, dass ZNS abstammende Antigene von APZs in den zervikalen Lymphknoten präsentiert werden. Lösliche ZNS abstammende Antigene werden über den Liquor cerebrospinalis zur nasalen Mucosa transportiert. Hier enden afferente lymphatische Gefäße, die die tiefen zervikalen Lymphknoten drainieren. Diese nehmen ZNS abstammende Antigene auf, die dort präsentiert werden können (Greter et al., 2005; Ransohoff and Engelhardt, 2012). Welche Relevanz dies für die Entstehung einer Immunreaktion hat, bleibt jedoch ungeklärt, da die Induktion einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) auch in Tieren ohne Lymphknoten erfolgen kann (Cserr and Knopf, 1992; Greter et al., 2005). Weiterhin konnte dargelegt werden, dass die normale ZNS Funktion und Regeneration von spezifischen Immunantworten abhängt (Hofstetter et al., 2003; Wolf et al., 2002).

Zwar ist das ZNS nicht wirklich immunprivilegiert, dennoch trennt als wichtigster Faktor zur Abschottung des ZNS, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) als physikalische Barriere das ZNS von der Peripherie. Sie limitiert die Einwanderung von Immunzellen, Pathogenen und den Übertritt verschiedener Substanzen, wie Zytokinen und Immunglobulinen aus dem Blut ins ZNS, wodurch sein besonderer Status aufrechterhalten wird. Die Basis der BHS bildet das nicht-fenestrierte über tight junctions verbundene Endothel, welches von einer Basallamina, gebildet von Astrozytenausläufern, umgeben wird. Zwischen dem Endothel und der Basallamina befindet sich der perivaskuläre Raum, der unter anderem die Perizyten zur Stabilisierung der Gefäße, glatte Muskelzellen, perivaskuläre M Φ und DC beherbergt (Allt and Lawrenson, 2001).

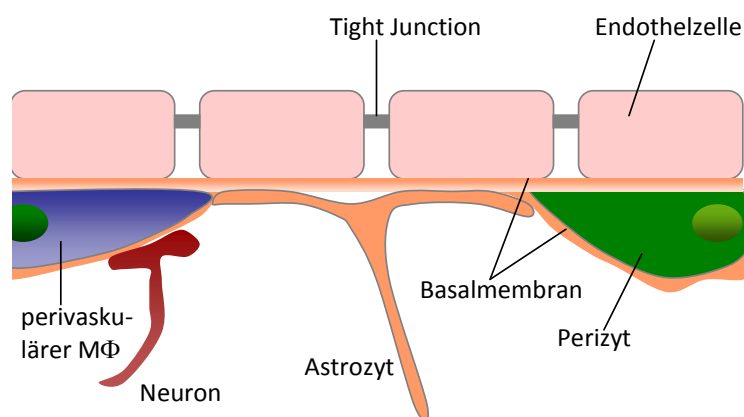


Abbildung 1.3 Die Blut-Hirn-Schranke.
Modifiziert nach (Abbott et al., 2010)


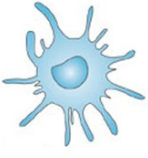

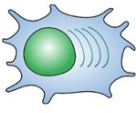

Die BHS schottet das gesamte ZNS vom peripheren Blut- und Lymphkreislauf ab mit Ausnahme des Plexus choroideus, welcher für die Produktion des Liquor cerebrospinalis verantwortlich ist (Cserr and Bundgaard, 1984). Durch die Isolation wird im ZNS ein besonderes Milieu aufrechterhalten, welches Immunantworten basal inhibiert. Dieser Status wird z.B. durch die Produktion des transforming growth factor β (TGF β) (Gordon et al., 1998), die Abwesenheit der MHC Klasse II Expression im basalen Zustand (Becher et al., 2001; Becher et al., 2003), die konstitutive Expression

des Fas-Liganden (Flugel et al., 2000) und eine fehlende direkte Verbindung zum lymphatischen System und damit erschwerte Antigenpräsentation mit folgender Induktion einer T Zell-Antwort gewährleistet (Su and Sinko, 2006). Somit stellt das ZNS einen besonderen Ort der Immunregulation und eine Herausforderung für eine Induktion und Aufrechterhaltung von Immunantworten dar.

1.4 Dendritische Zellen

DCs wurden 1973 von Ralph Steinman entdeckt und stellen eine sehr heterogene Zellpopulation mit unterschiedlichen Funktionen dar (Steinman and Cohn, 1973). Sie sind hämatopoetischen Ursprungs und gelten als die effektivsten APZs. Alle DC Subtypen besitzen die Fähigkeit der Antigenaufnahme, seiner Prozessierung und Präsentation an naive T Zellen und damit deren Aktivierung. Somit stellen sie eine wichtige Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar.

Die funktionelle Diversität ist mit ihrem Differenzierungsstatus und ihrer Lokalisation verbunden (Ardavin, 2003; Banchereau et al., 2000). DCs können aufgrund ihrer Funktionalität oder Oberflächenmarker-Expression klassifiziert werden. Funktionell lassen sich DCs in fünf Subpopulationen, einteilen (Guilliams et al., 2010).

	Langerhans Zelle	CD11b ⁺ DC	CD8 α ⁺ DC	pDC	inflammatorische DC
klassische phänotypische Charakterisierung	 CD207 ⁺ CD103 ⁻ CD11b ⁺	 CD207 ⁻ CD11b ⁺ CD11c ^{high}	 CD207 ^{+/-} CD8 α ⁺ CD103 ⁺ CD11c ^{high} CD11b ^{low/-}	 Siglec-H ⁺ CD11c ^{low}	 Ly6C ⁺ MAC3 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ^{high}
PRR Expression	?	RIG-I; MDA5; DAI NOD	TLR3 ^{high}	TLR7/9	TLR4 ^{high} NOD
Funktion	?	CD4 ⁺ T Zell Aktivierung humorale Immunität Antwort auf extrazelluläre Parasiten	Kreuz-Präsentation CD8 ⁺ T Zell Aktivierung, IL-12p70	antivirale Antworten IFN α / β	angeborene Immun- antworten gegen Infektionen, ROS/NOS

* abwesend in nicht-lymphatischen Geweben

Abbildung 1.4 Funktionelles Modell muriner DC Subpopulationen.

Funktionelle Einteilung muriner DCs unabhängig von ihrer primären Lokalisation. Die dargestellten DC-Populationen sind sowohl in peripheren Geweben, mit Ausnahme der CD8 α ⁺ DCs, als auch in sekundären lymphatischen Organen zu finden. Modifiziert nach (Guilliams et al., 2010)

Klassifizierungen, die auf der Expression von Oberflächenmarkern beruhen, unterscheiden vor allem zwischen klassischen oder konventionellen DCs (cDCs) und plasmazytoiden DCs (pDCs). Während cDCs auf die Induktion einer T Zell Antwort spezialisiert sind, werden pDCs als professionelle Typ I

IFN produzierende Zellen bezeichnet und haben vor allem immunmodulatorische Funktionen. Phänotypisch sind cDCs durch eine Expression der Oberflächenmarker $CD11c^{high}$, $CD8\alpha^{+/-}$, $CD11b^{+/-}$ und $B220^{-}$ gekennzeichnet, während pDCs durch $CD11c^{low}$, $B220^{+}$, $Siglec-H^{+}$ charakterisiert sind.

DCs stellen eine kleine Zellpopulation dar und machen nur etwa 2 % der Gesamtzellen der Milz von C57BL/6-Mäusen aus. Bei BALB/c-Mäusen hingegen bilden DCs nur ca. 1,2 % der Gesamtzellzahl der Milz. $CD11b^{+}$ DCs stellen dabei die größte Population mit ca. 1,5 % dar, $CD8\alpha^{+}$ ca. 0,4 % und pDCs nur ca. 0,1 % (Asselin-Paturel et al., 2003). Unter naiven Bedingungen liegen DCs verstreut im Milzgewebe vor, wobei cDCs vor allem in der MZ und der äußeren periarteriolen Scheide vorliegen. pDCs hingegen sind vor allem in der T Zell-Zone lokalisiert. Nach Toll-like Rezeptor (TLR)-Stimulation migrieren cDCs in die innere periarteriolen Scheide bzw. T Zell-Zone, während pDCs Anhäufungen in der MZ und der T Zell-Zone bilden (Asselin-Paturel et al., 2005; Reis e Sousa et al., 1997).

1.5 Mikroglia

Mikroglia wurden erstmals 1932 von del Rio-Hortega beschrieben. Sie werden auch als die Immunzellen oder $M\Phi$ des ZNS bezeichnet, da sie viele $M\Phi$ -assoziierte Marker wie $CD11b$, $CD14$ und $F4/80$ exprimieren und einen gemeinsamen Ursprung teilen (Kettenmann et al., 2011). Sie stammen ontogenetisch von den Dottersack- $M\Phi$ ab und wandern während der Embryonalentwicklung ins ZNS ein. Mikroglia erneuern sich ZNS-intern, wobei sie sich durch ihre Langlebigkeit auszeichnen. Durch ihre stark verzweigte Morphologie und die enge Interaktion mit Neuronen unterscheiden sie sich jedoch von aus der Peripherie stammenden $M\Phi$ (Saijo and Glass, 2011). In Abhängigkeit der Hirnregion machen sie 5-20 % der Gliazellen, bestehend aus Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten, aus und weisen eine hohe Heterogenität auf (Lawson et al., 1990). Diese basiert auf der unterschiedlichen Morphologie, dem Aktivierungsstatus und der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (Schmid et al., 2002). Unter Normalbedingungen agieren Mikroglia als Hüter des ZNS. Sie reorganisieren konstant und dynamisch ihre Verzweigungen, wodurch sie das umliegende Gewebe ständig auf Pathogene, apoptotische Zellen oder Verletzungen untersuchen. So prüfen sie das gesamte Gehirn innerhalb weniger Stunden (Nimmerjahn et al., 2005). Weiterhin spielen Mikroglia während der Entwicklung und Lernprozessen bei der Anpassung von schwachen Synapsen zwischen Neuronen eine wichtige Rolle (Hughes, 2012).

Nach ihrer Aktivierung durch Pathogene, Verletzungen oder inflammatorische Stimuli proliferieren Mikroglia, nehmen eine amöboide Morphologie an und migrieren entlang eines Chemokingradienten zum inflammatorischen Fokus. Hier phagozytieren sie Pathogene und Zellreste, produzieren zur weiteren Rekrutierung von Immunzellen inflammatorische Zytokine und Chemokine und nehmen durch Heraufregulation von MHC und kostimulatorischen Molekülen an der T Zell Aktivierung teil (Garden and Moller, 2006; Maehlen et al., 1989; Sedgwick et al., 1998).

1.6 Pattern recognition receptors

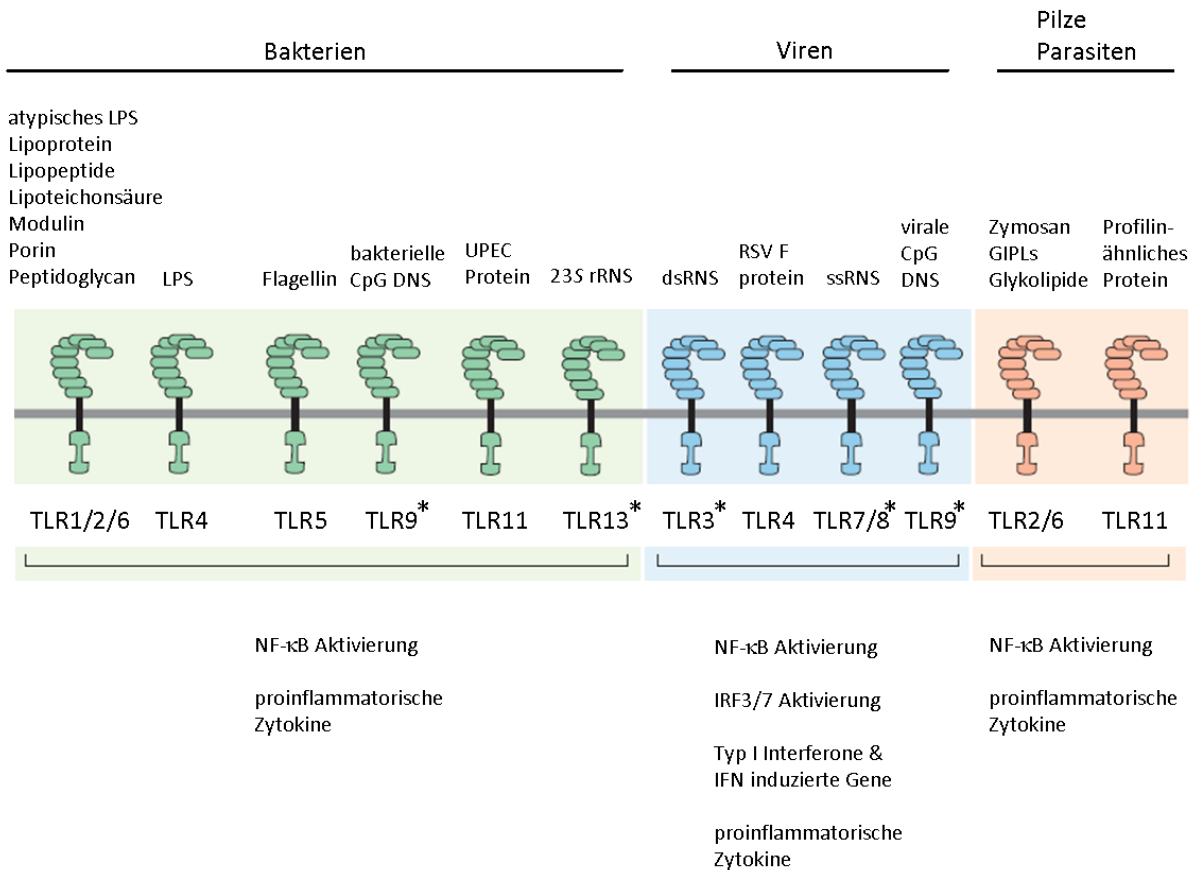
Das angeborene Immunsystem detektiert die Anwesenheit von Pathogenen über das keimbahnkodierte System der PRRs, die molekulare Pathogenkomponenten, die PAMPs, Moleküle oder spezifische Molekülmodifikationen, wie sie so Pathogene unterschiedlichster Herkunft, nicht aber im Wirt anzutreffen sind, erkennen (Kawai and Akira, 2010). Zu den PRRs zählen die zytoplasmatischen RIG-I like helicases (RLRs), bestehend aus den Helikasen retinoic acid-inducible gene (RIG-I), melanoma-differentiation associated protein (MDA)5 und laboratory of genetics and physiology (Lgp)2. Diese sind für die Erkennung viraler doppelsträngiger Ribonukleinsäuren (dsRNS) verantwortlich. Zu den Nukleinsäure erkennenden zytoplasmatischen Rezeptoren werden außerdem DAI und die RNS Polymerase III gezählt. Eine weitere Familie der intrazellulären PRRs bilden die nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-Rezeptoren oder auch NOD-like Rezeptoren (NLRs), die sich aus über 20 Mitgliedern zusammensetzen (Wilmanski et al., 2008). Diese binden bakterielle PAMPs und Zellstress-induzierende Faktoren, wie z.B. IL-1 β . Die am besten untersuchte Gruppe der PRRs umfasst die membranständigen extra- und intrazellulär lokalisierten TLRs, bestehend aus 10 bzw. 12 Mitgliedern. Weiterhin zählen Scavenger-Rezeptoren und C-Typ Lektin-Rezeptoren zu den PRRs. Bindet ein PRR seinen Liganden kommt es zur Zellaktivierung und einer verstärkten Antigenpräsentation.

1.6.1 Toll-like Rezeptoren

Die TLRs sind zu dem Drosophilamolekül TOLL ortholog, welches für die Entwicklung der dorsoventralen Achse und bei der Abwehr von Pilzinfektionen eine wichtige Rolle spielt (Lemaitre et al., 1996). Der erste humane Toll-ähnliche Rezeptor wurde von Ruslan Medzhitov und Charles Janeway charakterisiert (Medzhitov et al., 1997). Bis heute sind 10 funktionelle Mitglieder beim Menschen und 12 bei der Maus bekannt. TLR10 ist bei der Maus aufgrund einer retroviralen Insertion nicht-funktionell, während die TLRs 11, 12 und 13 im humanen Genom nicht kodiert sind (Kawai and Akira, 2010; Oldenburg et al., 2012). Alle TLRs sind membranständige Proteine mit einer Leucin-reichen Ectodomäne (leucine rich region, LRR), die für die Ligandenbindung verantwortlich ist, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären, signaltransduzierenden Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) Domäne. Nach Ligandenexposition kommt es zur Dimerisierung und Konformationsänderung der intrazellulären TIR-Domäne und zur Bindung unterschiedlicher Adaptormoleküle, die die Signalkaskade zweier möglicher Signalwege vermitteln. Am Ende dieser Signalkaskaden kommt es zur Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern und zur Genexpression. Das Adaptormolekül myeloid differentiation primary response gene (MyD)88 wird für die Signalweiterleitung direkt an die TIR-Domäne aller TLRs mit Ausnahme des TLR3 rekrutiert, während das TIR-domain containing adaptor-inducing interferon β (TRIF) nur von den TLRs 3 und 4 rekrutiert wird. Die Signalkaskade über MyD88 führt über den Transkriptionsfaktor nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) zur Induktion proinflammatorischer Gene, während die TRIF-abhängige Signalkaskade über den interferon regulatory factor (IRF)3 zu einer Induktion des Zytokins Interferon β (IFN β) führt. Durch die Rekrutierung weiterer verschiedener Adaptormoleküle in Abhängigkeit des TLRs kommt es nach Ligandenbindung somit zu einer

Pathogen-spezifischen Immunantwort.

Zu den PAMPs, die durch das TLR System erkannt werden zählen Lipide, Lipoproteine und Nucleinsäuren einer breiten Vielfalt von Pathogenen, wobei die Erkennung in verschiedenen zellulären Kompartimenten, wie Plasmamembran, Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen erfolgt (Akira, 2006). Dabei spielt die zelluläre Lokalisation der Rezeptoren für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Molekülen eine wichtige Rolle, da sie die Verfügbarkeit dieser Moleküle einschränkt.



*endosomal

Abbildung 1.5 Das TLR-System.

TLRs erkennen bakterielle, virale, Protozoen- und Pilz-abstammende PAMPs. TLR1/2 Heterodimere erkennen Triacyl-Lipopeptide; TLR2/6 Heterodimere binden Lipoteichonsäure; parasitäre Glykoinsitolphospholipide (GIPs) und Zymosan; TLR2 Homodimere, binden Peptidoglycan und atypisches Lipopolysaccharid (LPS); TLR4 bindet LPS und endogene Liganden; TLR5 bindet Flagellin; TLR9 bindet bakterielle und virale CpG DNS. Weitere virale Nucleinsäuren werden durch die TLRs 3 und 7/8 erkannt. TLR11 bindet ein bisher unbekanntes Protein von uropathogenem *Escherichia coli* und ein von *Toxoplasma gondii* abstammendes Profilin-ähnliches Protein. TLR13 bindet bakterielle 23S rRNS. Der Ligand und die Lokalisation von TLR12 sind bisher noch unbekannt. Modifiziert nach (West et al., 2006)

1.6.2 RIG-I ähnliche Rezeptoren

Die drei Mitglieder der RLR-Familie RIG-I, MDA5 und Lgp2 gehören zur DExD/H-box Helikase-Superfamilie, die als zytoplasmatische RNS Sensoren fungieren. Allen RLRs sind die C-terminale regulatorische Domäne und die Helikase-Domäne gemeinsam. Darüber hinaus besitzen RIG-I und MDA5 eine N-terminale caspase activation and recruitment domain (CARD). Sie werden von Immun- und Nicht-Immunzellen breit exprimiert. Der RLR Signalweg ist vom IFN β -promotor stimulator 1 (IPS1; auch bekannt als MAVS oder CARDIF) abhängig. Interaktionen zwischen IPS1 und den RLRs führen über die Transkriptionsfaktoren IRF1, 3 und 7 sowie NF- κ B zur Aktivierung von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen. Zusätzlich ist RIG-I in der Lage das Inflammasom über das Adaptorprotein Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) zu aktivieren (Desmet and Ishii, 2012).

Der bisher bekannte natürliche RIG-I Ligand ist eine kurze 5' tri-phosphorylierte RNS ohne Cap-Struktur, wobei mehrere Liganden aus dsRNS und einzelsträngiger (ss) RNS beschrieben werden konnten (Barbalat et al., 2011; Loo and Gale, 2011). Indirekt kann es auch über die Konversion von Pathogen-assoziiertes AT-reicher dsRNS in 5' tri-phosphorylierte dsRNS durch die RNS Polymerase III aktiviert werden (Chiu et al., 2009). MDA5 hingegen erkennt lange dsRNS Moleküle wie auch das virale Mimetikum polyI:C (Kato et al., 2008). LGP2 bindet die Termini von dsRNS und reguliert den RIG-I und MDA5 Signalweg positiv (Sato et al., 2010).

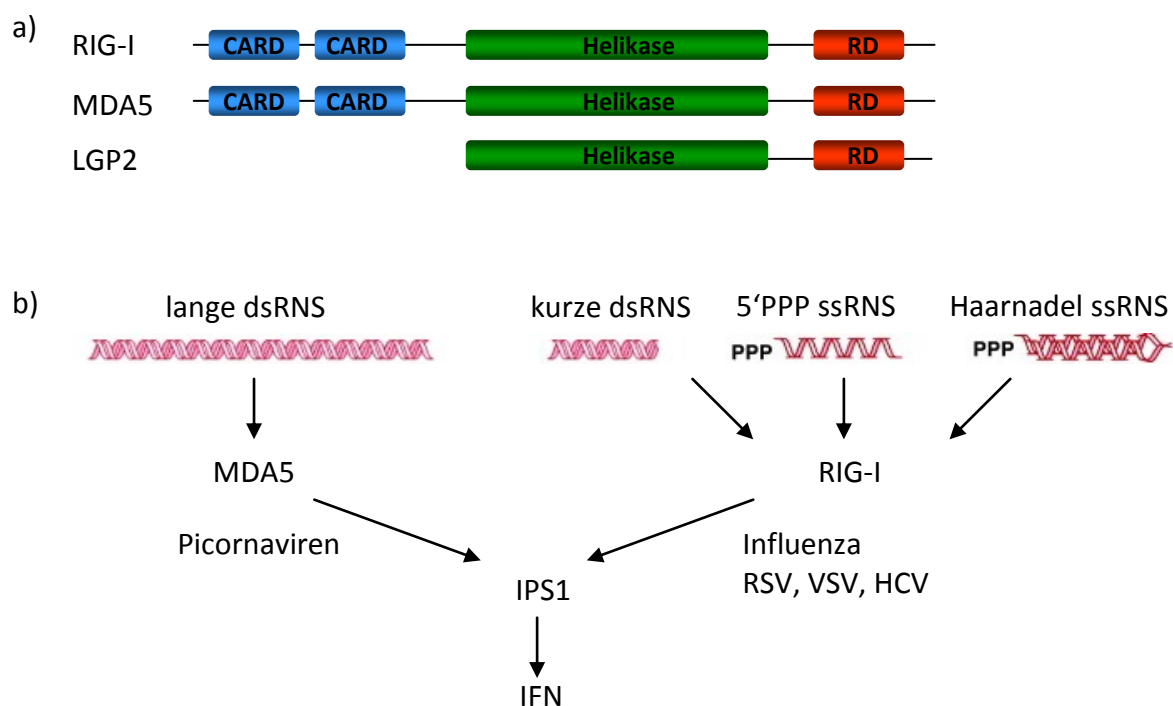


Abbildung 1.6 RIG-I ähnliche Rezeptoren und ihre Aktivierung.

a) Domänen der RLR-Familie. Die Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungs-Domäne (CARD) interagiert mit IPS1. Die Helikase-Domäne bindet die Liganden-RNS. Die C-terminale regulatorische Domäne (RD) bindet tri-Phosphate. b) MDA5 bindet lange dsRNS, während RIG-I kurze dsRNS oder 5'PPP-ssRNS bindet, welche linear ist oder eine Haarnadel-Struktur besitzt. Eine Bindung führt zur Interaktion mit IPS1 und einer IFN Induktion. Modifiziert nach (Bowzard et al., 2011)

1.7 Zytokine

Zytokine sind kleine, strukturell diverse Proteine, ca. 25 kDa groß, und werden durch verschiedene Zelltypen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in Antwort auf einen aktivierenden Stimulus sekretiert. Sie induzieren eine Antwort durch die Bindung an ihren spezifischen Rezeptor und üben ihre Wirkung in autokriner als auch in parakriner Weise aus. Damit tragen sie zu einer effektiven Immunantwort bei. Weiterhin spielen Zytokine bei der gegenseitigen Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle. Diese wird zusätzlich zu den Zytokinen, auch durch zellgebundene Moleküle gewährleistet. Durch die Etablierung eines spezifischen Zytokinmilieus in Antwort auf verschiedene Pathogene kommt es zu einer T Zell-Antwort, die jeweils maßgeschneidert ist gegen intra- oder extrazelluläre Erreger. Aufgrund ihrer Struktur werden diese löslichen Mediatoren in verschiedene Familien eingeteilt.

1.7.1 Typ I Interferone

IFNs wurden initial als lösliche Faktoren, die die virale Replikation inhibieren, beschrieben (Isaacs and Lindenmann, 1957). Mittlerweile bilden IFNs eine große Familie von strukturell verwandten Zytokinen, die während der frühen Immunantwort gegenüber Viren und anderen Pathogenen exprimiert werden. Sie üben anti-mikrobielle, anti-proliferative und immunmodulatorische Effekte aus. Zu den Typ I Interferonen in Maus und Mensch zählen IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN ζ und IFN ω . Bisher wurde nur ein IFN β Gen identifiziert, während insgesamt 13 humane und 14 murine IFN α Gene gefunden wurden. Alle Gene werden durch Intron-lose, beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 und bei der Maus auf Chromosom 4 liegende Sequenzen kodiert (Kelley et al., 1983; Owerbach et al., 1981). Vor allem pDCs und cDCs sind die Hauptproduzenten von IFN β *in vivo* (Scheu et al., 2008). Zusätzlich zu den Typ I IFNs kommt es zur Expression des Typ II IFN IFN γ , welches viele pro inflammatorische Effekte ausübt und die Differenzierung von T_H1-Effektorzellen fördert. Die IFN- λ s (auch bekannt als IL-28A, IL-28B und IL-29) bilden die Familie der Typ III IFNs und vermitteln wie die Typ I IFNs antivirale Effekte (Ank et al., 2008; Ank et al., 2006).

Die stärksten Induktoren der Typ I IFNs stellen virale Nukleinsäuren dar, die an intrazelluläre membranständige und zytoplasmatische PRRs des angeborenen Immunsystems binden. Deren Signalwege führen über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der IRF und NF- κ B Familie zur Induktion der IFN β Transkription. Über einen autokrinen und parakrinen positiven Rückkopplungsmechanismus führt IFN β zu einer Aktivierung der Transkription der übrigen Typ I IFNs und IFN stimulierter Gene (ISGs) und induziert den sogenannten antiviralen Status. Alle Typ I IFNs binden den gleichen Oberflächenrezeptor (IFNAR). Der IFNAR ist ein Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, die mit den Janus-Kinasen Jak1 und Tyk2 assoziiert sind. Nach der Bindung von Typ I IFN kommt es zur Aktivierung der Janus-Kinasen, wodurch es zu einer sequentiellen signal transducer and activator of transcription STAT2 und STAT1 Phosphorylierung kommt (Leung et al., 1995). Dies führt zur Rekrutierung des Transkriptionsfaktors IRF9. Der Komplex aus STAT1, STAT2 und IRF9 ist auch als ISGF3 bekannt, transloziert in den Zellkern und bindet an interferon stimulated response elements (ISRE), die zur Transkription vieler verschiedener Gene führen (Fu et al., 1990). Zusätzlich kann der Typ I IFN Signalweg zu einer STAT1 Homodimerbildung

führen, welche an interferon γ activated sequences (GAS) bindet.

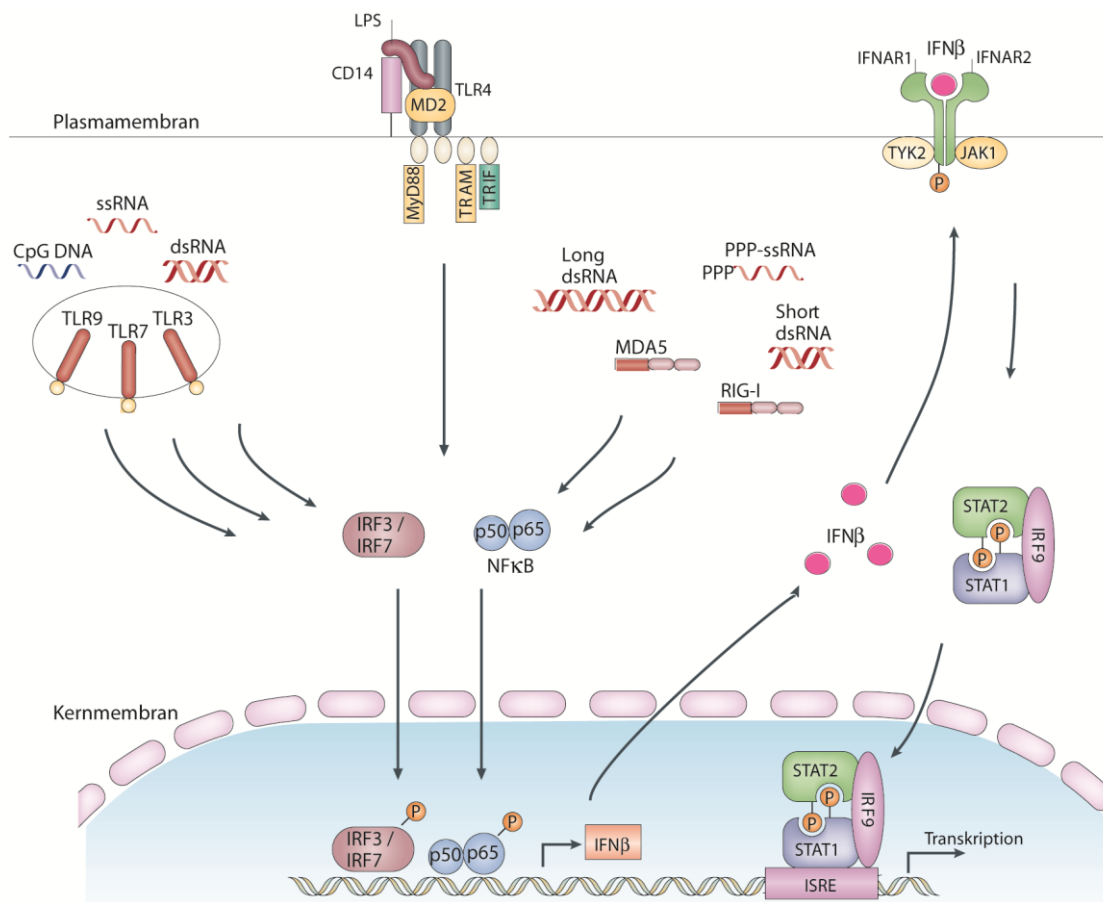


Abbildung 1.7 Produktion und Signalweg von Typ I Interferonen.
 Modifiziert nach (Bowie and Unterholzner, 2008)

Funktionell inhibieren Typ I IFNs die intrazelluläre Replikation von Viren und Bakterien. Zur Inhibition von viraler Replikation tragen vor allem die IFN induzierte Proteinkinase R (PKR), die die mikrobielle Translation inhibiert, die 2'5' Oligoadenylat Synthetase (OAS), die zur Degradation von mRNA führt, die RNaseL, die virale RNS durch RNS Editing inaktiviert und die Mx-Proteine, die den intrazellulären Transport viraler Partikel inhibieren, bei (Decker et al., 2005). Wichtige Typ I IFN induzierte Effektormechanismen im Kontext einer nicht-viralen Infektion stellen die induzierbare NO Synthase (iNOS), die zur Produktion von reaktiven Stickstoffintermediaten führt und die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), die die Verfügbarkeit der essentiellen Aminosäure Tryptophan reguliert, dar (Carlin and Weller, 1995; Gao et al., 1998). Neben diesen direkt anti-mikrobiellen Effektormechanismen tragen Typ I IFNs auch indirekt über die Aktivierung einer zellulären Immunantwort zur Eliminierung von Pathogenen bei. Typ I IFNs induzieren eine erhöhte MHC Klasse I-Expression, die zu einer verbesserten Erkennung von intrazellulären Pathogenen durch CD8⁺ zytotoxische T Zellen führt. Sie steigern die Zytotoxizität von NK Zellen, die phagozytotische Aktivität von MΦ und stimulieren die Sekretion von IL-12 und IFN γ , was zu einer Induktion einer zellvermittelten T_H1 Immunantwort führt. Diesen protektiven, immunmodulatorischen Effekten der Typ I IFNs stehen jedoch auch für den Wirt nachteilige Effekte gegenüber. Durch die Erhöhung der

Sensitivität von infizierten Zellen gegenüber Apoptose, kommt es nicht nur zu einer für den Wirt vorteilhaften Eingrenzung der Pathogenausbreitung und Verstärkung der Antigenpräsentation durch DCs, sondern auch zu einer nachteiligen Eliminierung von wichtigen Effektorzellen, was zu einer geschwächten Immunreaktion und einer verstärkten Pathogenausbreitung führen kann. Während einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* kommt es durch Typ I IFNs zu einer höheren Apoptose bei MΦ und T Zellen, was eine Depletion dieser wichtigen Effektorzellen nach sich zieht (Carrero et al., 2004; Stockinger et al., 2002). Durch ihren Einfluss auf verschiedene Zellen der angeborenen und die Regulation der adaptiven Immunantwort stellen Typ I IFNs eine wichtige Verbindung zwischen beiden Armen des Immunsystems dar.

1.7.1.2 Induktion der IFN β Transkription

Die Produktion der Typ I IFNs ist hauptsächlich auf der Ebene der Transkription reguliert. Die IFN β Expression wird selbst unter optimalen Stimulationsbedingungen nur in sehr geringen Zellfrequenzen aktiviert (Zhao et al., 2012). Der Promotor des IFN β Gens enthält vier positiv regulatorische Domänen (PRDs), die in einer geordneten Weise die Transkriptionsfaktoren IRF3/7 (PRD I+III), NF- κ B (PRD II) und AP-1 (PRD IV) rekrutieren und zusammen mit dem high-mobility group protein HMG-I(Y) einen Komplex bilden, der als Enhanceosome bekannt ist (Thanos and Maniatis, 1995). Dabei ist es notwendig, dass es zu einer interchromosomalen Interaktion der NF- κ B bindenden Loci kommt (Apostolou and Thanos, 2008). Dies führt zur Assemblierung des Enhanceosomes und Rekrutierung weiterer Faktoren wie Histon-Acetyl-Transferasen und eines Nukleosomen Modifikationskomplexes. Schließlich kommt es zur Dislokation des Nukleosoms, das die Transkriptions-Startsequenz blockiert (Agalioti et al., 2000).

1.7.2 Die IL-12 Zytokin-Familie

Eine weitere in dieser Dissertation untersuchte Zytokinfamilie wird durch die IL-12 Familie der heterodimeren Zytokine repräsentiert. Sie modulieren sowohl die frühe angeborene, als auch spätere adaptive Immunantworten. Zu den Mitgliedern zählen die Zytokine IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35.

IL-12, der Prototyp dieser Zytokinfamilie, ist ein Heterodimer, bestehend aus der 35 kDa leichten Kette p35 und der 40 kDa schweren Kette p40 (Kobayashi et al., 1989). Die Untereinheiten sind kovalent durch zwei Disulfid-Brücken verbunden. Die Hauptquelle der IL-12 Produktion stellen DCs und MΦ dar (Macatonia et al., 1995). *In vivo* wird IL-12 nach Stimulation vor allem von CD8 α^+ cDCs produziert (Reis e Sousa et al., 1997). Während p35 mRNA in vielen verschiedenen Zelltypen vorliegt, z.B. Lymphozyten, kann p40 mRNA nur in Zellen gefunden werden, die das biologisch aktive Heterodimer produzieren (D'Andrea et al., 1992). IL-12p40 wird in großen Mengen produziert, während nur sehr viel geringere Mengen der biologisch aktiven Formen von IL-12 detektiert werden können. Um die biologisch aktiven Heterodimere produzieren zu können, müssen jeweils beide Untereinheiten von ein und derselben Zelle exprimiert werden (Wolf et al., 1991). Der IL-12-Rezeptor ist ein Heterodimer aus den zwei Ketten IL-12R β 1 und IL-12R β 2. Der IL-12R wird vor allem von aktivierten T Zellen und NK Zellen exprimiert (Presky et al., 1996), aber auch von DCs und B Zelllinien

(Airoidi et al., 2000; Grohmann et al., 1998). IL-12p40 bindet die IL-12R β 1 Untereinheit, während IL-12p35 an IL-12R β 2 bindet. Der Rezeptor aktiviert den Jak-STAT Signalweg, wobei es nach Zytokinbindung zu einer Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Januskinasen Jak2 und Tyk2 kommt, die wiederum zu einer Aktivierung und Phosphorylierung mehrerer Transkriptionsfaktoren den STATs führt.

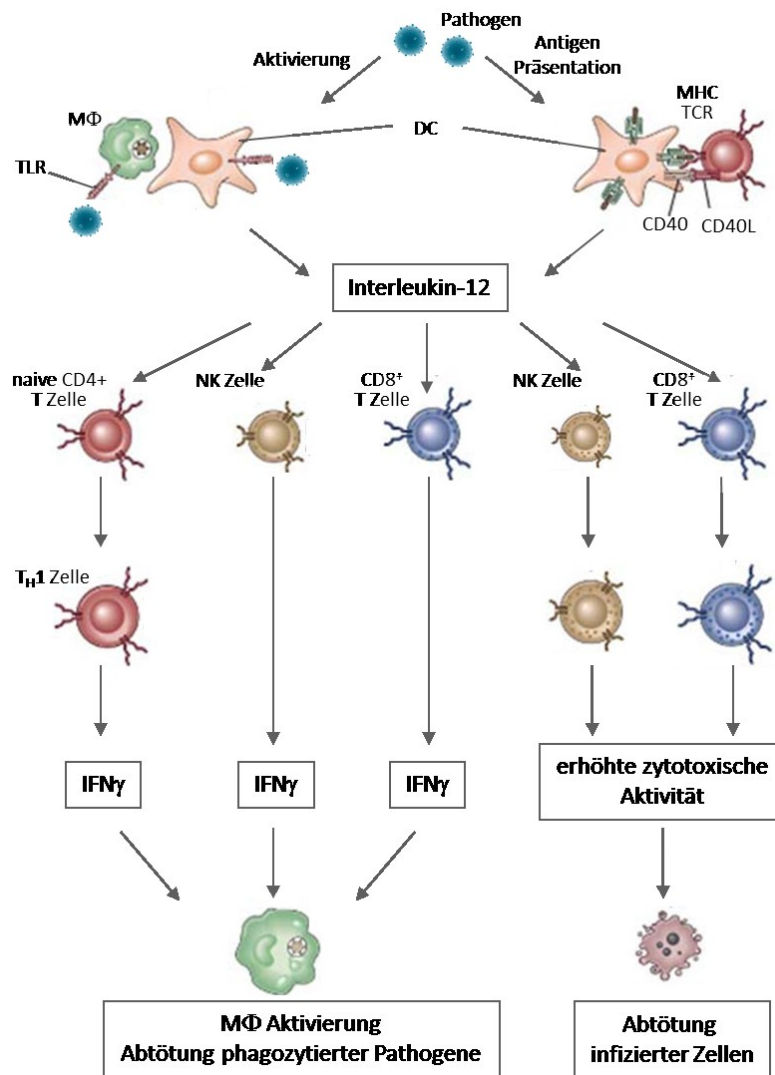


Abbildung 1.8 Biologische Funktionen von IL-12.

IL-12 wird von MΦ und DCs nach Stimulation durch Mikroorganismen oder durch Interaktion mit T Zellen, z.B. durch CD40-CD40L, produziert. IL-12 stimuliert IFN γ Sekretion, indem es die Differenzierung von naiven T Zellen zu T_H1 begünstigt, NK Zellen und zytotoxische T Zellen aktiviert. Weiterhin steigert es die Zytotoxizität von NK Zellen und zytotoxischen T Zellen. Beide Funktionen tragen zur Eliminierung von intrazellulären Pathogenen bei. Modifiziert nach (Abbas, A.K, Cellular and Molecular Immunology, 6th Edition, Seite 282)

IL-12 ist ein wichtiges Zytokin der frühen angeborenen Immunantwort und wird nach Aktivierung von TLRs, nach Aktivierung durch antigen-stimulierte T Helferzellen und durch IFN γ exprimiert. Es ist für die Induktion der zellvermittelten adaptiven Immunantwort von großer Bedeutung. IL-12 wurde *in vitro* als ein löslicher Mediator identifiziert, der in der Lage ist NK Zellen zur IFN γ Produktion anzuregen (Chan et al., 1992). Zusätzlich stimuliert es auch T_H1 Zellen IFN γ zu exprimieren. Dieses

vermittelt viele der proinflammatorischen Funktionen von IL-12.

IL-23, ein weiteres Mitglied der IL-12 Zytokinfamilie, ist ein Heterodimer bestehend aus der durch eine Disulfid-Brücke kovalent verbundenen leichten Kette p19 und der schweren Kette p40. Der IL-23R setzt sich aus den Untereinheiten IL-12R β 1 und dem IL-23R zusammen, wobei die IL-23R Untereinheit für die spezifische Bindung von IL-23p19 verantwortlich ist. Wie IL-12 wird auch das funktionelle Heterodimer von IL-23 vor allem von aktivierten DCs und M Φ exprimiert (Oppmann et al., 2000). Durch den Vergleich von IL-12/23p40^{-/-} und IL-12p35^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, dass IL-23 zur Eliminierung von anderen Pathogenen als IL-12 beiträgt. Dies weist darauf hin, dass diese Zytokine spezifische Funktionen bei der Resistenz gegenüber unterschiedlichen Pathogenen besitzen (Hunter, 2005). Eine wichtige Funktion von IL-23 besteht in der Aktivierung von T_H17 Zellen. Diese produzieren IL-17, den wichtigsten proinflammatorischen Mediator von IL-23. IL-17 kann zur Entstehung von autoimmunen Erkrankungen oder während einer Infektion zu einer protektiven Immunantwort beitragen (Langrish et al., 2004).

IL-27 setzt sich aus den Untereinheiten p28 und Epstein-Barr-Virus-induced gene (EBI)3 zusammen (Pflanz et al., 2002). Sein Rezeptor besteht aus den Untereinheiten IL-27R und gp130. Die Hauptproduzenten sind APZs. Eine der wichtigsten Funktionen, die IL-27 vermittelt, ist die Inhibition der T_H17 Entwicklung. Mäuse, die für den IL-27R defizient sind weisen eine höhere Suszeptibilität gegenüber der experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis (EAE) auf, was mit einer höheren T_H17 Anzahl korrelierte (Batten et al., 2006).

Das jüngste Mitglied der IL-12 Familie ist IL-35. Es setzt sich aus den Untereinheiten EBI3 und p35 zusammen und wird konstitutiv von regulatorischen T Zellen produziert (Niedbala et al., 2007). Es vermittelt ihre suppressive Aktivität und inhibiert z.B. die IL-17 Produktion und mildert die Kollagen induzierte Arthritis ab (Goriely et al., 2008). Bei einer IL-35 Defizienz kommt es zu einer erschwerten Kontrolle einer Inflammation, was in einem Modell für chronische Darmkrankheiten gezeigt werden konnte (Collison et al., 2007).

1.8 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS mit unbekannter Ätiologie. Autoreaktive, myelinspezifische T Zellen greifen die Myelinscheide der Neuronen an, wodurch es zu einer Inflammation und Aktivierung weiterer Effektormechanismen kommt. Diese führen schließlich zu einer Demyelinisierung der Neurone und zur Neurodegeneration (Gold et al., 2006). Die ersten klinischen Symptome treten meist im frühen Erwachsenenalter in der zweiten oder dritten Dekade auf, wobei die Prädominanz bei Frauen gegenüber Männern bei 2:1 liegt (Noseworthy et al., 2000). Weltweit sind ca. 1,5 bis 2 Millionen Menschen, mit der höchsten Prävalenz in Nord-Amerika, Nord-Europa und Kanada (Ascherio and Munger, 2008), von der MS betroffen. Die MS wird zu den multifaktoriellen Erkrankungen gezählt, die durch Interaktionen von Umwelt- und genetischen Faktoren entsteht (Hoffjan and Akkad, 2010). Zu den MS begünstigenden Faktoren werden demnach genetische, geographische und ethnische Ursachen sowie Infektionen gezählt. Als sicherer genetischer Prädispositionsfaktor wurde die Expression der humanen Leukozyten Antigene (HLA) Klasse II Allele DR15/DQw6 in Kaukasiern nachgewiesen (Olerup and

Hillert, 1991). Weiterhin haben epidemiologische Studien erwiesen, dass eine Umwelt-Komponente mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls zur MS-Prädisposition beiträgt. So führt die Migration von Hoch- in Niedrig-Endemiegebiete vor dem Jungendalter zu einem erniedrigten MS-Risiko (Gale and Martyn, 1995). Als letzte zur MS beitragende Komponente wird der Einfluss von Infektionen mit dem humanen Herpesvirus 6 (HHV6) (Soldan et al., 1997), *Chlamydia pneumoniae* (Sriram et al., 1999) oder dem Epstein-Barr-Virus zur diskutiert (Ascherio et al., 2012). Die MS ist in den westlichen Industrieländern die häufigste neurologische Erkrankung des ZNS und daher von wichtiger sozialer und medizinischer Relevanz.

1.8.1 Klinischer Verlauf und Therapie der Multiplen Sklerose

Bis heute bleibt die MS unheilbar. Durch die Gabe von Immunsuppressiva oder Entzündungshemmern kann nur eine symptomatische Therapie vorgenommen werden. Klinisch präsentiert sich die MS in drei verschiedenen Ausprägungen. Die häufigste unter ihnen ist die schubförmige MS (relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS) mit 85-90 % Inzidenz. Diese führt zu einer phasenweisen akuten Verschlechterung der Symptome mit einer folgenden Remission. Im Laufe der Zeit kommt es zu einer verminderten Regeneration und einer Akkumulation von neurologischen Defiziten (Moreau and Confavreux, 2000). Die anfallartigen akuten Verschlechterungen sind durch sensorische Störungen, unilaterale optische Neuritis, Schwäche der Extremitäten, die bis hin zu Lähmungserscheinungen reichen können, gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf leiden die Patienten an voranschreitender Quadriparese, die mit kognitiver Verschlechterung, Ataxie, Spastiken und Beeinträchtigungen von Blasen- und Darmfunktion verbunden sein kann (Hafler, 2004; Noseworthy et al., 2000; Tienari, 1994). Zur Basistherapie der RRMS zählen Glatirameracetat, ein Gemisch aus Polypeptiden, die dem Myelin basischem Protein ähnlich sind und die Therapie mit IFN β . Diese senken die Schubrate und mildern die Symptomatik (Ford et al., 2006; Panitch, 1995; Paty and Li, 1993). Eine genaue Beschreibung der IFN β Therapie in der MS wird im folgenden Abschnitt im Detail behandelt, da es einen zentralen Teil dieser Arbeit bildet. Bei einer Nicht-Responsivität auf die Basistherapie mit IFN β werden die zur Eskalationstherapie zählenden Therapeutika eingesetzt. Hierbei kommt es unter anderem zum Einsatz des monoklonalen humanisierten Antikörpers Natalizumab. Dieses richtet sich gegen das Adhäsionsmolekül α_4 -Integrin und inhibiert effektiv die Einwanderung weiterer Effektorzellen in das ZNS. Ein weiteres wichtiges Therapeutikum der Eskalationstherapie ist Fingolimod. Es stellt ein Sphingosin-1-Phosphat Analogon dar und führt zur Retention von T Lymphozyten in den Lymphknoten, da der S1P-Rezeptor für ihre Rezirkulation essentiell ist (Matloubian et al., 2004). Der Einsatz von Natalizumab und Fingolimod sollte jedoch mit großer Vorsicht vorgenommen werden, da sie zu Neoplasien oder Immunsuppression führen (Garber, 2008; Yousry et al., 2006). Alternativ kann eine Behandlung durch hochdosierte Glukokortikoide oder Zytostatika, die eine Rückbildung der Symptome induzieren, durchgeführt werden. Sie wirken entzündungshemmend und verringern die Permeabilität der BHS.

In ca. 40 % der Fälle geht die RRMS in die sekundär-progrediente Form (SPMS) über, wobei es zu einer kontinuierlichen Verschlechterung der Symptome kommt. Zur Behandlung der SPMS wird das Zytostatikum Mitoxantron eingesetzt, welches die Reifung und Proliferation wichtiger Effektorzellen der MS inhibiert (Esposito et al., 2010; Neuhaus et al., 2006). IFN β ist hier nur in wenigen Fällen

wirksam (Kappos et al., 2004). Zusätzlich kann eine hochdosierte Glukokortikoid-Therapie eingesetzt werden. In ca. 10 % beginnt die MS als primäre-progrediente MS (PPMS), die von einer kontinuierlichen Progression der neurologischen Defizite charakterisiert ist. Der klinische Verlauf ist individuell sehr variabel und erlaubt kaum prognostische Aussagen zum Verlauf der Krankheit. PPMS-Patienten, leiden an einer chronisch progredienten Myelopathie, Sehverlust und Hirnstamm-Syndromen, die zu Störungen in Motorik und Sensibilität führen (Noseworthy et al., 2000). Die PPMS kann in einem fulminantem Verlauf innerhalb eines Jahres zum Tod des Patienten führen. Die Therapie der PPMS kann mit Glukokortikoiden oder Zytostatika versucht werden (Schwartzman et al., 2009). Weiterhin kann eine symptomatische Therapie von Spastiken, Schmerzen, Blasendysfunktion und Sprech- und Schluckstörungen medikamentös und physiotherapeutisch erfolgen.

1.8.2 Therapie der Multiplen Sklerose mit Interferonen

Die seit 1993 meistangewandte und erfolgreichste Therapie der RRMS besteht in der systemischen Gabe von IFN β (Paty and Li, 1993). Seine positive Wirkung auf den Verlauf der Krankheit konnte bereits in vielen Studien bewiesen werden. So vermindert IFN β die Frequenz und den Schweregrad der klinischen Exazerbationen, aber auch das Fortschreiten der Krankheit (Panitch, 1995). Die IFN β Therapie führt jedoch nur partiell zum Erfolg, da es in ca. 30 % der Fälle zu einer mechanistisch, bisher nicht aufgeklärten Unresponsivität kommt (Axtell et al., 2010), weshalb der Einsatz der bereits erwähnten Eskalationstherapeutika von großer Bedeutung bleibt. Weiterhin kann es im Verlauf der IFN β Therapie innerhalb von 6 – 18 Monaten zur Ausbildung von neutralisierenden Antikörpern (NAB) kommen, die ebenfalls zu einer Ineffektivität führen können (1996; Sorensen, 2012). Hierbei kommt es zu einer Erhöhung der Schubfrequenzen und Vergrößerung der Läsionen im ZNS. Daher wird empfohlen die Titer der neutralisierenden Antikörper zu beobachten und darauf basierend die Therapie anzupassen.

Trotz seiner Nebenwirkungen und der bestehenden oder erworbenen Unresponsivität bleibt IFN β das bisher erfolgreichste Therapeutikum der MS. Der Erfolg scheint in seiner pleiotropen Wirkung zu liegen, wodurch es viele verschiedene Funktionen vermittelt. In den letzten Jahren konnten verschiedene Wirkmechanismen der IFN β -vermittelten positiven Effekte aufgeklärt werden. IFN β inhibiert z.B. die Produktion der Matrixmetalloproteinase (MMP)-9 (Nelissen et al., 2002). Diese trägt während der MS zu Gewebeschäden, Inflammation und Demyelinisierung bei (Cuzner and Opdenakker, 1999). Außerdem erleichtert die MMP9 die Invasion von Effektorzellen ins ZNS. Weiterhin inhibiert IFN β die Fähigkeit von T Zellen und anderer Leukozyten die BHS zu überqueren und somit den Eintritt ins ZNS. Dieser Effekt wird durch die Herunterregulation des VLA-4 Adhäsionsmoleküls auf T Zellen, welches für die Extravasation benötigt wird, vermittelt. Zusätzlich wird die Abspaltung des VLA-4 Gegenspielers, des VCAM-Adhäsionsmoleküls auf dem BHS-Endothel induziert. Das lösliche VCAM kann somit die erneute VLA-4-vermittelte Bindung weiterer Effektorzellen verhindern (Calabresi et al., 1997). Ein weiterer relevanter IFN β -vermittelter Effekt ist die Herunterregulation von MHC Klasse II Molekülen auf APZs und die Heraufregulation der inhibitorischen Kostimulatoren PD-L1 und PD-L2 auf M Φ , welcher zu einer Inaktivierung und Apoptose von T_{eff} Zellen beiträgt. Somit kommt es zu einer erniedrigten Aktivierung und einer erhöhten Inaktivierung von T_{eff} Zellen (Teige et al., 2003; Wiesemann et al., 2008). Weitere protektive

Effekte sind die Sensibilisierung von T_{eff} gegenüber Apoptose und die Inhibition des proinflammatorischen Zytokins IL-17 (Sweeney et al., 2011).

In Europa sind zurzeit drei IFN β -Präparate für die Behandlung der RRMS zugelassen. Diese werden subkutan oder intramuskulär verabreicht. IFN β -1a (Rebif[®], MerckSerono; Avonex[®], Biogen Idec) wird in Säugertierzellen produziert und besitzt eine mit dem menschlichen IFN β identische Aminosäuresequenz. Das in *E. coli* produzierte IFN β -1b (Betaferon[®], Bayer-Schering) verfügt an zwei Stellen über einen Aminosäureaustausch, welches die pharmakologische Stabilität erhöhen soll. Studien zur Wirksamkeit der unterschiedlichen Präparate konnten keine Unterschiede in der Wirksamkeit feststellen ((Ärztezeitung, 27.06.2007) letzter Aufruf 13.11.2012). Die mit der IFN β Therapie einhergehenden Nebenwirkungen beinhalten unter anderem grippale Symptome wie Fieber, Schüttelfrost und Muskelschmerzen, sowie auch Depressionen. Weiterhin kann es zu lokalen Hautreaktionen kommen. Trotz intensiver Forschung bleibt die körpereigene Quelle des IFN β aufgrund seiner erschwerten Detektierbarkeit unbekannt. Die Relevanz der endogenen IFN β Expression konnte bereits im Tiermodell nachgewiesen werden. So zeigten IFN β defiziente Mäuse einen schwereren klinischen Verlauf der Krankheit (Teige et al., 2003). Auf der Grundlage der Kenntnis der endogenen Quelle des IFN β im Verlauf der MS wäre die Entwicklung zellspezifischer Therapieansätze möglich.

1.8.3 Tiermodelle der Multiplen Sklerose

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) stellt das am besten untersuchte und am weitesten verbreitete Tiermodell der MS dar (Baxter, 2007). Weitere bedeutende Tiermodelle sind die durch Cuprizone induzierte toxische Demyelinisierung und die Infektion mit dem Theiler-Virus (Kipp et al., 2009; Tsunoda and Fujinami, 2010). Die EAE ist eine Autoimmunkrankheit, die durch die Immunisierung mit Peptiden der Myelinscheide induziert werden kann. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der adaptiven Immunantwort und einer Antigen-spezifischen Immunantwort gegen das endogene Myelinantigen. Die EAE spiegelt somit Teilaspekte der MS wider (Gold et al., 2006). Historisch gilt Louis Pasteur als einer der Vorreiter des heutigen EAE-Modells. Er unternahm Vakzinierungsversuche mit aus Tollwut infizierten Kaninchen-Rückenmarkshomogenaten, die als Nebenwirkung fortschreitende Lähmungserscheinungen zur Folge hatten (Stuart and Krikorian, 1933). Die Induktion von Lähmungserscheinungen in Rhesusaffen mittels gesundem Hirngewebe aus Kaninchen konnte schließlich durch Assoziation mit Hirn-spezifischen Antikörpern zeigen, dass es sich um eine antigenspezifische Immunreaktion handeln musste (Schwentker and Rivers, 1934). Das darauf folgend beschriebene komplette Freund'sche Adjuvants (CFA) (Freund and Opie, 1938), eine Emulsion aus Paraffinöl und abgetötetem *Mycobacterium tuberculosis*, ermöglichte durch die kombinierte Immunisierung mit Kaninchen-Hirngewebe eine Induktion von Lähmungserscheinungen nach nur wenigen Immunisierungen. Fortan wurde dieses Krankheitsbild als EAE definiert (Kabat et al., 1947; Morgan, 1947). Die Einführung des aus *Bordetella pertussis* stammenden Pertussis-Toxins (PTX) verstärkte die Induktion des Krankheitsbildes zusätzlich (Bernard and Carnegie, 1975). Die EAE konnte bisher in verschiedenen Tierarten etabliert werden, wobei die Maus durch die hohe Anzahl an genetisch veränderten Linien das wichtigste Experimentaltier repräsentiert. Mittels Deletion oder der transgenen Expression von Genen konnte ihre Beteiligung in der Pathogenese der EAE untersucht

werden. Durch die Verwendung verschiedener Myelinantigene wurden mehrere EAE-Modelle etabliert, die in Abhängigkeit vom Mausstamm Unterschiede im klinischen Verlauf hervorrufen, von relapsierenden-remittierenden bis hin zu chronischen Verläufen (Gold et al., 2006). Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell, die MOG₃₅₋₅₅ induzierte EAE, führt zu einem chronischen Verlauf und einer T Zell-vermittelten Autoimmun- und Entzündungsreaktion. Diese kann aktiv durch die Immunisierung mit dem MOG₃₅₋₅₅ Peptid in Kombination mit CFA und PTX und passiv durch den Transfer von enzephalitogenen antigenspezifischen T Zellen induziert werden (Lipton and Freund, 1953; Paterson, 1960). Die Entzündung bleibt vor allem auf das Rückenmark und Kleinhirn beschränkt. Zu Beginn der Erkrankung, der zwischen d11-13 liegt, kommt es zu einer ascendierenden Lähmung des Schwanzes und der folgenden Lähmung der Hinterbeine. Der Schweregrad der Erkrankung wird dabei mittels eines klinischen Scores beurteilt (s. Tab. 4.7).

1.8.4 Pathogenese der Multiplen Sklerose und EAE

Die Pathogenese der MS und der EAE konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Die hohe Komplexität und Heterogenität der Erkrankung weist auf unterschiedliche Entstehungsmechanismen hin. Bei der MS sowie der EAE kommt es zu einem antigenspezifischem CD4⁺ T Zell-vermitteltem Angriff gegen verschiedene Antigene der Myelinscheide der Neuronen, der zur Demyelinisierung und Axondegeneration führt (Gold et al., 2006).

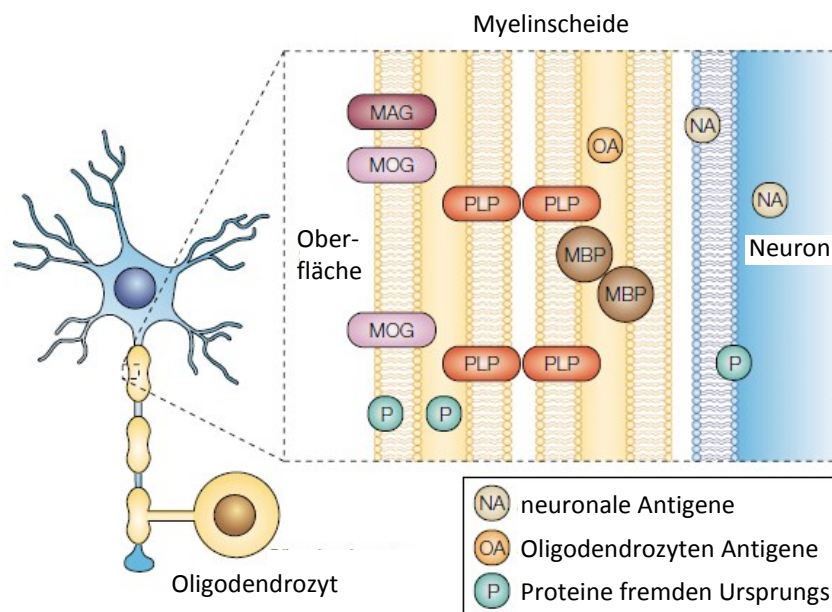


Abbildung 1.9 Zielantigene der weißen Substanz in der MS.

Proteine der Myelinscheide, von Oligodendrozyten und Neuronen stellen wichtige Ziele der Auto-Immunität in der MS dar. MAG: Myelin-assoziiertes Glykoprotein; MBP: Myelin-basisches-Protein; MOG: Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; PLP: Proteolipid-Protein. Modifiziert nach (Hemmer et al., 2002)

Zu diesen Antigenen werden vor allem das Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), das Myelin-basische-Protein (MBP), das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) und das Proteolipid-Protein (PLP) gezählt. Die Myelinscheide wird durch die Oligodendrozyten gebildet und wirkt als

isolierende, die Axone umgebende Schicht. Bei einer Schädigung dieser Schicht kommt es zu einer eingeschränkten oder ausbleibenden Reizweiterleitung, die sich in Dysfunktion von Muskeln und Nerven äußert. In dieser Arbeit wurde die EAE durch die Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ in Kombination mit PTX und hitzeinaktivierten *M. tuberculosis* enthaltendem CFA induziert. Dies führt zu einer Sensibilisierung der Versuchstiere für die EAE (Dal Canto et al., 1995; Kabat et al., 1951; Wekerle, 1993). In erster Linie wird das angeborene Immunsystem aktiviert. APZs erkennen und phagozytieren die im CFA enthaltenen PAMPs, was gleichzeitig zu ihrer Aktivierung beiträgt. Das Paraffinöl dagegen sorgt für die Langlebigkeit der Antigene und für eine Optimierung ihrer Aufnahme (Billiau and Matthys, 2001). Dies führt zur Produktion verschiedener Zytokine, die zur Aktivierung der adaptiven Antwort beitragen. So kommt es zur anschließenden Induktion der T_H1 Antwort und der Produktion von TNF α , GM-CSF, IL-6, IL-10 und MCP-3 (Sugisaki et al., 1998). Die zusätzliche Gabe des PTX sorgt für eine verstärkte Reaktion. Es bindet irreversibel G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren und unterbricht deren Signalprozesse, wodurch es zu einer gestörten Immigration von T und B Zellen in die sekundären lymphatischen Organe kommt. Weiterhin trägt es zu einer höheren Permeabilität der BHS bei, was eine erhöhte Einwanderung enzephalitogener T Zellen begünstigt. Die durch das PTX vermittelte Apoptose von T_{regs} wirkt ebenfalls verstärkend (Cassan et al., 2006). Eine Hypothese zur Aktivierung der autoreaktiven T Zellen in der MS besagt, dass es zum Transport löslichen Myelinantigens in die sekundären lymphatischen Organe kommt, welches hier von residenten APZs phagozytiert und über MHC Klasse II an autoreaktive T-Helferzellen präsentiert wird (Carson et al., 1999). Nach ihrer Aktivierung überqueren die enzephalitogenen T_H17 Zellen in einer ersten Migrationswelle Chemokin-Rezeptor (CCR6)-abhängig die Blut-Hirn-Schranke, während die spätere Migration CCR6-unabhängig erfolgt. CCL20, der Ligand für CCR6, wird konstitutiv von Epithelzellen des Plexus choroideus sekretiert und rekrutiert somit CCR6 exprimierende T_H17 Zellen in das Gehirn (Reboldi et al., 2009). Die immigrierten T Zellen werden nun von APZs durch MHC Klasse II-Präsentation des spezifischen Myelinantigens reaktiviert. Diese APZs konnten als Gefäß-assoziierte DCs identifiziert werden (Greter et al., 2005). Die reaktivierten T Zellen sekretieren Zytokine, die die Permeabilität der BHS erhöhen und ein vermehrtes Eindringen weiterer T Zellen, B Zellen, M Φ sowie DCs ermöglichen. Kürzlich wurde das Zytokin granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) als essentielles Zytokin für die Entstehung der murinen experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis beschrieben. Dieses allein führte zur Induktion einer Neuroinflammation und Rekrutierung weiterer Effektorzellen (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011). In der Effektorphase kommt es durch unterschiedliche Effektormechanismen schließlich zur Zerstörung der neuronalen Myelinscheide und zur Neurodegeneration. Durch die direkte Interaktion von CD8⁺ zytotoxischen T Zellen (CTL) kommt es zu einer Fas- und TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-vermittelten Apoptose und der Ausschüttung zytotoxischer Granula, die ebenfalls zur Apoptose führen (Aktas et al., 2005). Weiterhin kommt es zur Sekretion neurotoxischer Substanzen und exzitatorischer Aminosäuren, die über den NMDA-Rezeptor toxisch wirken (Grasselli et al., 2012). B Zellen sekretieren antigenspezifische Antikörper, die schließlich zur Komplementaktivierung und Lyse der Zellen führen (Archelos et al., 2000; Piddlesden and Morgan, 1993). Antikörper scheinen vor allem in der chronischen Phase eine wichtige Rolle zu spielen (Hemmer et al., 2002). Lösliche Mediatoren die vor allem von Mikroglia und M Φ sezerniert werden, richten ebenfalls großen Schaden an. TNF α kann in Oligodendrozyten Apoptose induzieren, reaktive Sauerstoff und Stickstoff Spezies (ROS und NOS)

tragen ebenfalls zum Tod von Oligodendrozyten und Neurodegeneration bei (Paintlia et al., 2011). Die Autoimmunreaktion führt zu einer erneuten Freisetzung von Autoantigenen, die zu einer wiederholten Aktivierung einer Immunantwort führen können.

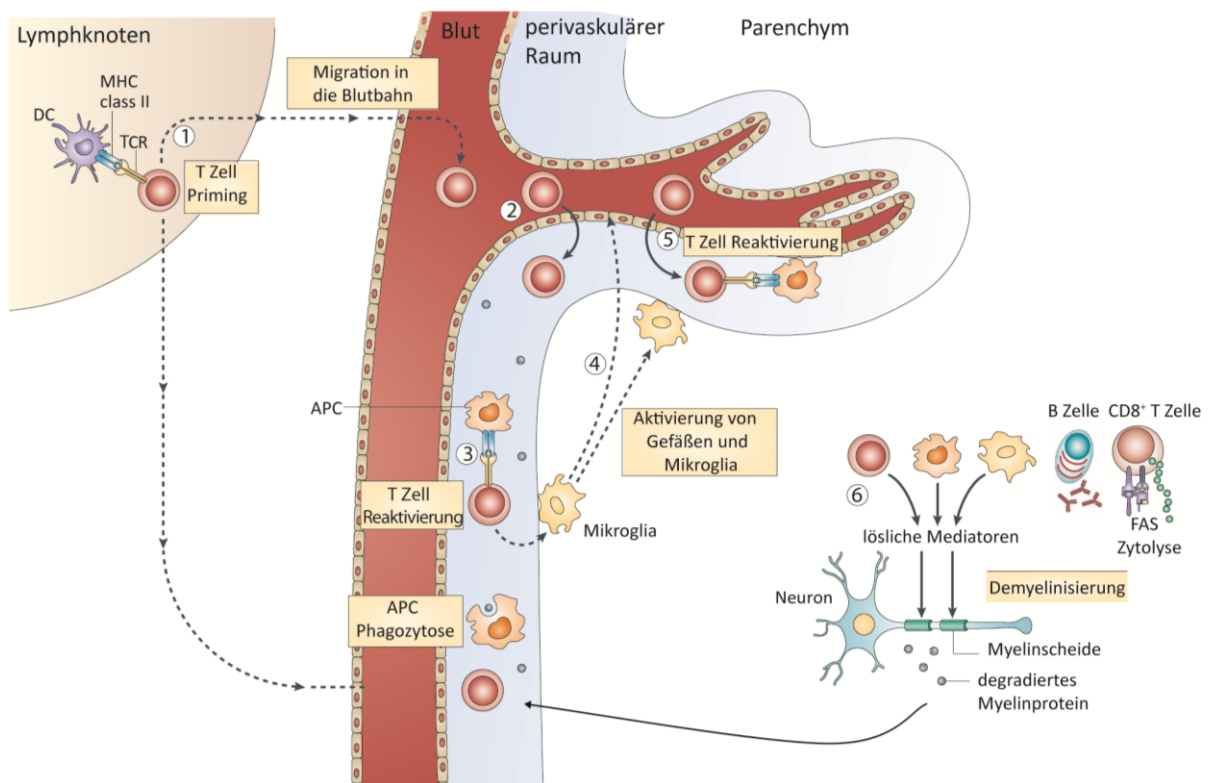


Abbildung 1.10 Pathogenese der EAE.

[1] CD4⁺ T Zellen werden in der Peripherie durch APZs aktiviert, die Myelinantigene oder kreuzreagierende Antigene im MHC Klasse II-Kontext präsentieren. Myelinantigene drainieren in löslicher Form zu den zervikalen Lymphknoten und werden hier von APZs phagozytiert oder werden von ZNS lokalisierten APZs in die zervikalen Lymphknoten gebracht. [2] CD4⁺ T Zellen migrieren in den perivaskulären Raum über den Plexus choroideus oder die meningealen Venolen. [3] Die eingewanderten T Zellen werden im perivaskulären Raum über Myelinantigen-produzierende APZ reaktiviert. [4] Die reaktivierten T Zellen führen zur Gefäß- und Mikrogliaaktivierung. [5] Weitere CD4⁺ T Zellen überqueren die BHS und werden ebenfalls reaktiviert. [6] Reaktivierte T Zellen migrieren ins Parenchym und üben gemeinsam mit aktivierten Mikroglia, APZs, Antikörper-produzierenden B Zellen und CD8⁺ T Zellen toxische Effekte aus. Modifiziert nach (Goverman, 2009)

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die IFN β Expression und seine Wirkung in den Modellen der EAE und der polymikrobiellen Peritonitis untersucht. Wie bereits erwähnt vermittelt IFN β pleiotrope immunmodulatorische Wirkungen. Durch sein großes Wirkspektrum beeinflusst es Immunantworten in positiver als auch negativer Weise. Das hier dargestellte Modell der EAE ist ein Beispiel, in dem IFN β einen protektiven Effekt vermittelt und zu einem milderem Verlauf der Erkrankung führt. Im Gegensatz dazu wirkt sich IFN β auf den Verlauf vieler bakterieller Infektionen nachteilig aus. Ein Beispiel dafür stellt die, im folgenden Abschnitt eingeführte, polymikrobielle Peritonitis mit der anschließenden Sepsis dar. Hierbei kommt es zu einer verstärkten Immunantwort und einer detrimetellen Immunpathologie.

1.9 Sepsis

Die Sepsis ist eine komplexe Dysregulation einer Entzündungsreaktion beruhend auf einer Infektion. Im Volksmund ist die Sepsis unter der Blutvergiftung bekannt. Bei einem fulminanten Verlauf kann es dabei zu einem septischen Schock kommen. Liegen die Symptome des systemischen inflammatorischen Response Syndroms (SIRS), der Nachweis einer Infektion und eine anhaltende Hypotonie vor, spricht man von einem septischen Schock. Der Schweregrad der Erkrankung wird nach den von der ACCP/SCCM Consensus Conference des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine 1992 definierten vier Schweregraden festgelegt (Bone et al., 1992).

Die proinflammatorische Dysregulation kann dabei zu Schäden multipler Organe führen, die durch Endothel-, Epithel- und Immunzellen vermittelt werden. Bis heute bleibt die Sepsis eines der häufigsten Krankheitsbilder auf chirurgischen und internistischen Intensivstationen und ist mit einer hohen Mortalität verbunden. Die Prävalenz der Sepsis auf Intensivstationen in Deutschland liegt bei 12,4 %, der schweren Sepsis und des septischen Schocks bei 11 % bei einer Mortalität der schweren Sepsis von 55,2 %. Somit zählt die Sepsis mit ca. 57.000 Todesfällen pro Jahr neben kardiovaskulären und neoplastischen Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland (Dellinger et al., 2008; Engel et al., 2007; Moss and Martin, 2004). Die empfohlene Therapie ist sehr vielseitig jedoch, wie an der hohen Mortalität erkennbar, in vielen Fällen erfolglos. Die Empfehlungen reichen von der Fokussanierung, also Entfernung des Infektionsherdes, über antibiotische Therapie bis hin zur supportiven Therapie wie der hämodynamischen Stabilisierung, Volumentherapie oder Nierenersatzverfahren und vielen anderen Ansätzen ((AWMFOonline, 2010)letzter Aufruf 7.11.2012.) Patienten, die eine schwere Sepsis überleben, haben eine 26 % ige Sterbewahrscheinlichkeit innerhalb des ersten Jahres und besitzen gegenüber Sekundärinfektionen eine erhöhte Mortalitätsrate innerhalb der nächsten acht Jahre (Perl et al., 1995; Quartin et al., 1997). Die Grundlage bildet eine dysregulierte Immunantwort, die in einer Immunsuppression ihren Ursprung hat (Hotchkiss et al., 2009). Somit ist das Verständnis der immunologischen Grundlagen der Sepsis von großer Bedeutung und spielt für die Entwicklung neuer Therapieansätze eine große Rolle.

1.9.1 Immunologische Grundlagen der Sepsis

Die inflammatorische Immunantwort im Verlauf der Sepsis kann in zwei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase spiegelt sich im SIRS wider, worauf ein kompensatorisches antiinflammatorisches Syndrom (CARS) folgt (Bone, 1996). Dabei dient die SIRS der Elimination des verursachenden Agens. Durch die assoziierte Vasodilatation kommt es zu einem erhöhten Blutfluss und einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Diese hat ein erhöhtes Angebot an Sauerstoff, wichtigen Mediatoren und Immunzellen im Gewebe zur Folge. Die CARS sorgt für die Terminierung der Immunreaktion und Herstellung der Homöostase. Kommt es während einer Sepsis jedoch zu einem Ungleichgewicht dieser Antwort, kann das zu exzessiver Inflammation, Ischämie, Multi-Organversagen oder folgender Immunsuppression führen (Buras et al., 2005).

Die Ursache dieser Erkrankung stellt wie bereits erwähnt eine systemische Infektion mit Mikroorganismen verschiedenen Ursprungs dar. In bis zu 60 % der Fälle liegt eine Infektion mit Gram negativen Keimen vor, wobei LPS die pathologische Hauptkomponente darstellt (Cohen, 2002). Initial kommt es zu einer Erkennung der Anwesenheit des Pathogens bzw. seiner PAMPs über keimbahnkodierte PRRs von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Die dadurch initiierte inflammatorische Antwort beinhaltet die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie TNF α , IL-18, IL-1 β , IL-6, IFN γ und Typ I IFN, sowie dem negativen Regulator IL-10. TNF α und IL-1 β gelten dabei als die prototypischen Zytokine, die die immunopathologischen Charakteristika eines LPS-induzierten Schocks vermitteln (Dinarello, 1997). Sie werden innerhalb von 30 – 90 Minuten nach Erkennung von LPS freigesetzt und aktivieren weitere proinflammatorische Mediatoren wie Zytokine, Lipid-Mediatoren und reaktive Sauerstoff-Spezies. Zusätzlich induzieren sie die Heraufregulation von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, was in einer Zelleinwanderung resultiert. Die ersten immigrierenden Zellen werden vor allem durch Neutrophile repräsentiert. Weiterhin kann LPS zu einer Aktivierung der Koagulationskaskade beitragen, die zu einer disseminierten intravaskulären Koagulopathie und einer verminderten Organperfusion mit Organversagen führen (Levi and Ten Cate, 1999).

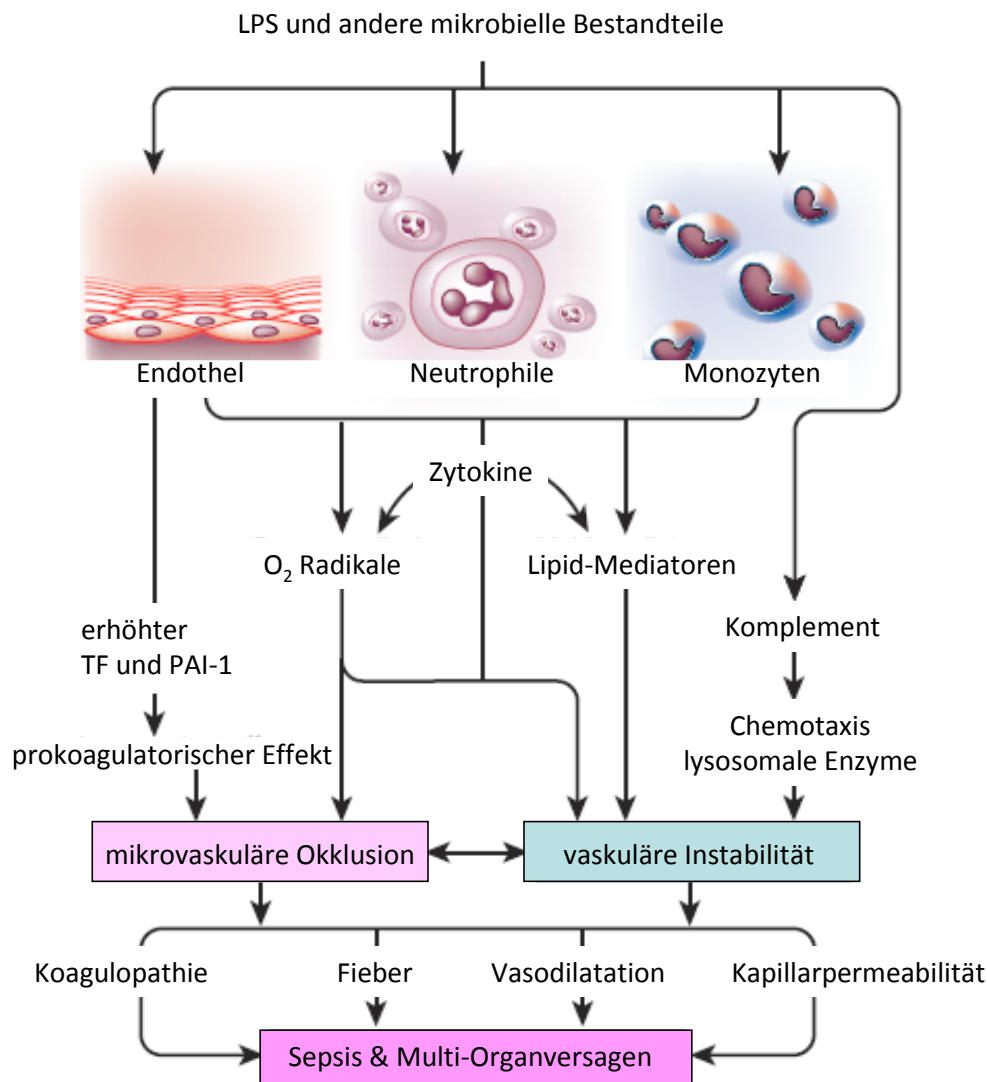


Abbildung 1.11 Pathogenetisches Netzwerk des Schocks.

Mikrobielle Komponenten aktivieren simultan Kaskaden, die zum Schock führen. Durch Aktivierung des Endothels kommt es zu einer erhöhten Expression des TF, der zur Aktivierung der Koagulationskaskade beiträgt und in der Fibrin-Bildung mündet. Gleichzeitig kommt es zur Sekretion von PAI-1, welches den Fibrin-Abbau inhibiert, so dass es zu einer Koagulopathie kommt. Weiterhin kommt es zu einer Aktivierung von Granulozyten und Monozyten, die proinflammatorische Mediatoren produzieren und zu einer Komplement-Aktivierung beitragen. Diese Mechanismen münden schließlich im Schock und Multi-Organversagen. TF: *Tissue Factor*; PAI-1: *plasminogen-activator-inhibitor-1*. Modifiziert nach (Cohen, 2002)

Die Mediatoren der gegenregulatorischen CARS beinhalten lösliche TNF α Rezeptoren, den IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA), Inaktivatoren der Komplementkaskade und antiinflammatorische Zytokine wie IL-10. Ein weiterer Mechanismus, der eine Herunterregulation der Immunantwort zur Folge hat, ist die Apoptose von B Zellen und CD4⁺ T Zellen (Hotchkiss et al., 2001). Dies führt zu einer Immunsuppression mit Lymphopenie, Hyporesponsivität und Anergie von T Zellen. Die angeborene Immunantwort ist ebenfalls supprimiert. Es kommt z.B. zu einer Depletion von cDCs aus der Milz mit anschließender Repopulation. Diese repopulierenden DCs weisen jedoch eine Dysregulation in ihrer Zytokinproduktion auf. So wurde z.B. eine verminderte IL-12p40 Produktion, einem wichtigen T_H1-Zytokin und einer vermehrten IL-10 Produktion nachgewiesen (Flohe et al., 2006; Wen et al., 2008;

Wen et al., 2006). Weiterhin besitzen DCs auch Wochen nach einer Sepsis eine verminderte Fähigkeit zur Aktivierung von T Zellen. Somit stellt die Sepsis sowohl eine akute als auch eine chronische Gefahr für die Gesundheit von betroffenen Patienten dar.

1.9.2 Tiermodelle der Sepsis

Anhand der unterschiedlichen Induktionswege lassen sich die bisher angewandten Sepsismodelle in drei verschiedene Gruppen einteilen: 1. exogene Administration eines Toxins, z.B. LPS, 2. exogene Administration eines lebenden Pathogens, z.B. Bakterien, 3. die Störung der endogenen Barriereintegrität des Colons, was zu einer bakteriellen Translokation in den Peritonealraum führt. Das zentrale Ziel eines Sepsismodells ist es, eine möglichst der humanen Sepsis ähnliche Pathogenese zu induzieren, sowie die begleitenden klinischen Merkmale zu rekapitulieren (Buras et al., 2005). Dabei ist die Induktion einer hyperdynamischen mit nachfolgender hypodynamischer Antwort von großem Interesse.

Die Administration eines isolierten Agens spiegelt die hohe Komplexität der physiologischen Antwort nicht wider, die durch die Vermehrung lebender Bakterien hervorgerufen wird. Hierbei wird ein Schock durch eine Bolus-Injektion eines TLR-Agonisten induziert. Diese Modelle sind in der Handhabung sehr leicht und humane Studien konnten zeigen, dass die Administration von LPS zu pathophysiologischen Sepsis-ähnlichen Veränderungen führt (Fink and Heard, 1990). Die Bolus-Injektion führt zu einer überschießenden Antwort des angeborenen Immunsystems, begleitet von einer Überproduktion proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF α (Beutler and Poltorak, 2001; Cohen, 2002; Riedemann et al., 2003). Es kommt jedoch nur zu einer vorübergehenden Erhöhung der Zytokinkonzentrationen. Eine klinische Sepsis ist dagegen durch eine verlängerte Erhöhung systemischer Zytokinlevel, die im Vergleich zur Bolus-Injektion in niedrigeren Konzentrationen vorliegt, charakterisiert (Fink and Heard, 1990). Weiterhin kommt es nur zu einem hypodynamischem kardiovaskulären Status. Dieses Modell spiegelt die hämodynamischen Veränderungen einer Sepsis jedoch nicht wider und trägt nur begrenzt zum Verständnis dieser komplexen Erkrankung bei.

Auch die Verabreichung lebender Bakterien war bisher noch nicht zielführend, da es nach einer Administration hoher Bakteriendosen zur Komplementaktivierung und Lyse der Pathogene kommt. Somit sind diese oft nicht in der Lage innerhalb des Wirtes zu replizieren. Daher kommt dieses Modell dem der Toxin-Administration näher als einer tatsächlichen Infektion.

Das der Sepsis am ähnlichsten kommende Modell ist die Störung der Barrierefunktion des Colons mittels eines operativen Eingriffs, wobei zwischen der Colon-Ligation und Punktur (CLP) und der Colon-ascendens Stent-Peritonitis (CASP) unterschieden wird. Das CLP Modell wurde bereits vor über 30 Jahren entwickelt und simuliert die Ruptur einer Appendizitis oder perforierten Divertikulitis, einer Dickdarmerkrankung. Dabei wird das Zökum ligiert und mittels einer Nadel punktiert. Die Größe der Nadel und die Anzahl der Einstiche bestimmen den Schweregrad. So kommt es zu einer Darmperforation mit septischem Fokus, und Faeces treten in die Peritonealhöhle aus. Die folgende Infektion resultiert aus dem Austritt der gemischten Darmflora. Zusätzlich kommt es zur Gewebnekrose und Abszessbildung (Ayala et al., 2000; Wichterman et al., 1980). Die Vorteile dieser Technik liegen in der Durchführbarkeit und einem verglichen mit dem Humansystem relativ ähnlichen Verlauf, da die CLP die hämodynamischen und metabolischen Phasen einer Sepsis

widerspiegelt. In der Vergangenheit wurden jedoch immer wieder widersprüchliche Daten im Kontext der CLP publiziert. So kam es z.B. zu unterschiedlichen Überlebensraten im gleichen Experimentalansatz, so dass die Variabilität dieses Modells nicht vernachlässigt werden darf (Oberholzer et al., 2002).

Das CASP-Modell, welches in dieser Arbeit zur Induktion einer Sepsis angewandt wurde, simuliert die Komplikationen einer postoperativen Sepsis. Das Einführen eines venösen Stents mit einem definierten Durchmesser in das *Colon ascendens* bildet einen stetigen septischen Fokus und führt somit zu einem kontinuierlichen Austritt von Darminhalt ins Peritoneum (Maier et al., 2004; Zantl et al., 1998).

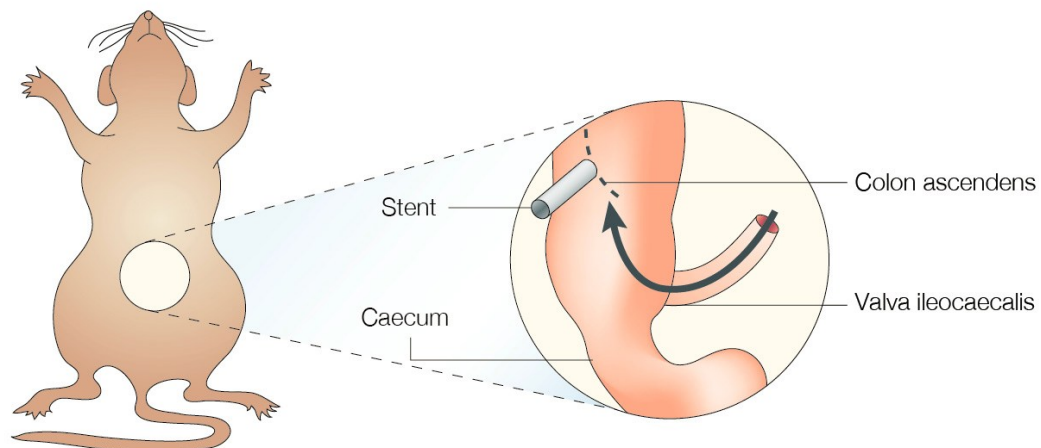


Abbildung 1.12 Schematische Darstellung der CASP-OP.
Modifiziert nach (Buras et al., 2005)

Durch die Entfernung des Stents kann eine operative Intervention simuliert werden und abhängig vom Zeitpunkt zu einem Überleben des Versuchstieres beitragen. Zusätzlich kommt es zu einer systemischen Streuung der Infektion, wobei eine Bakteriämie bereits nach 12 h detektiert werden kann. Eine Erhöhung der systemischen LPS-Konzentration ist bereits nach 2 h messbar. Weiterhin konnte die Entwicklung des SIRS und CARS mittels Zytokinanalysen bestätigt werden (Emmanuilidis et al., 2001; Zantl et al., 1998). Eine weitere Studie konnte einen Zusammenhang zwischen einer erniedrigten prä-operativen IL-12 Konzentration und einer höheren Mortalität in Maus und Mensch aufzeigen (Hensler et al., 1998; Weighardt et al., 2002).

Im direkten Vergleich der CASP und CLP wies die CASP höhere Zytokinspiegel und eine höhere Bakteriämie auf (Maier et al., 2004). Außerdem blieb die Verbindung zwischen Peritoneum und Darmlumen in der CASP länger bestehen. In der CLP wurde die Öffnung nach kürzerer Zeit verschlossen und eine Abszessbildung induziert. Somit sollte die Wahl des Modells mit großer Vorsicht erfolgen, da diese unterschiedliche Krankheitsmodelle imitieren, was unterschiedliche Immunantworten induziert. Für IFN γ -defiziente Tiere z.B. konnte gezeigt werden, dass diese in der CASP hochsuszeptibel sind, während sie normale Überlebensraten in der CLP aufwiesen (Zantl et al., 1998). Somit könnte das IFN γ -System eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung einer systemischen Bakteriämie spielen.

1.9.3 Virusinfektion, Typ I IFN und polymikrobielle Peritonitis

Humane Studien konnten in der Vergangenheit zeigen, dass eine Virusinfektion die Suszeptibilität gegenüber einer bakteriellen Sekundärinfektion im Patienten erhöht. So erhöht z.B. das Influenza-Virus die Mortalität einer Infektion mit bakteriellen respiratorischen Pathogenen (Leung and Hashimoto, 1986; Schneider-Schaulies et al., 2001). Die klinischen Symptome einer bakteriellen Superinfektion im Verlauf einer akuten Virusinfektion sind ernster und dauern über einen längeren Zeitraum an (Beadling and Slifka, 2004). Die mechanistischen Grundlagen bleiben jedoch weitgehend ungeklärt. Im Tiermodell geben virale-bakterielle Ko-Infektionsmodelle die Beobachtungen beim Menschen wider. So führt eine akute virale Infektion mit einer anschließenden bakteriellen Infektion zu einer höheren Mortalität. Dabei sind die Versuchstiere gegenüber dem bakteriellen Stimulus um ein Vielfaches sensibler, was mit einer höheren inflammatorischen Antwort verbunden ist. So sind bereits sublethale Dosen von LPS während einer Infektion mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) lethal (Nansen et al., 1997). Mechanistisch wurden unter anderem Typ I IFN als wichtiger Mediator dieses Phänomens identifiziert. So potenziert das durch einen viralen Stimulus induzierte Typ I IFN die proinflammatorische Antwort nach einer bakteriellen Stimulation mittels CLP und trägt zum letalen Schock bei (Doughty et al., 2006). Dabei wurden polyI:C stimulierte Wildtyp-Mäuse (wt) nach 24 h einer CLP unterzogen und wiesen höhere Werte für die proinflammatorischen Mediatoren TNF α und IL-6 auf. Dies war mit einem höheren Versterben der Versuchstiere und einer höheren bakteriellen Last assoziiert. IFNAR^{-/-} hingegen waren vor einer immunpathologischen proinflammatorischen Antwort geschützt und zeigten eine geringere Mortalität (Doughty et al., 2006). Zusätzlich konnte im CASP Modell gezeigt werden, dass IFNAR^{-/-} per se gegenüber einer Immunpathologie resistent sind, da sie ein höheres Überleben und eine höhere Aktivität von Granulozyten zeigten. Diese agieren als wichtige Effektorzellen bei der bakteriellen Elimination (Weighardt et al., 2006). Die Rolle der Typ I IFN bleibt in der Sepsis kontrovers. So konnte im Modell der CLP für IFNAR^{-/-} eine höhere Mortalität aufgrund einer geringeren Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten nachgewiesen werden. Diese Publikationen liefern somit widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Relevanz der Typ I IFN in der Sepsis. Dies lässt sich auf Unterschiede in den Experimentalansätzen und den angewandten Tiermodellen zurückführen, da diese wie bereits beschrieben zu unterschiedlichen physiologischen Reaktionen führen.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

IFN β vermittelt aufgrund seiner pleiotropen Wirkmechanismen in der Immunantwort in verschiedenen Krankheiten und entsprechenden Experimentalmodellen gegensätzliche Funktionen. Im Autoimmunmodell der EAE spielt IFN β eine essentielle protektive Rolle. Im Gegensatz dazu übt eine Typ I IFN Antwort im Infektionsmodell der polymikrobiellen Peritonitis einen detrimentalen Effekt aus. Aufgrund der nur begrenzten Nachweisbarkeit von IFN β , konnte die zelluläre Quelle von IFN β bisher nur sehr eingeschränkt identifiziert werden. Zur Charakterisierung der IFN β Expression, soll diese mit Hilfe des bicistronischen Reportermausmodells auf Einzellzebene im Modell der EAE und der polymikrobiellen Peritonitis untersucht werden.

Im ersten Abschnitt der Arbeit sollen mittels des Modells der EAE die für die IFN β Expression verantwortlichen Zellpopulationen im Rahmen einer zerebralen Autoimmunität identifiziert und charakterisiert werden. Um den Mechanismus und das physiologische Umfeld der IFN β Expression näher zu charakterisieren, soll die zelluläre Komposition und das vorherrschende Zytokinprofil in der Peripherie und dem ZNS im Verlauf der EAE analysiert werden. In Ergänzung der Untersuchungen der zellulären Quelle des IFN β in der EAE soll ermittelt werden, welche Zellen des ZNS nach Stimulation mit bekannten IFN β induzierenden Pathogenbestandteilen IFN β exprimieren.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit soll im Kontext der CASP, des hier verwendeten Modells für eine polymikrobielle Peritonitis, erstmals der Einfluss einer mittels polyI:C simulierten, viral induzierten IFN β Antwort auf den Verlauf der Krankheit untersucht werden. Zusätzlich soll die biologische Relevanz von IFN β in der polymikrobiellen Peritonitis mittels IFN β -defizienter Mäuse aufgeklärt werden.

2. Ergebnisse

2.1 Untersuchung der IFN β Expression in einem Modell für Multiple Sklerose

Die EAE stellt ein geeignetes Tiermodell dar, um die immunologischen Grundlagen der MS zu untersuchen. Der protektive Effekt von IFN β in der MS ist unumstritten und IFN β stellt daher das meistverschriebene Initialtherapeutikum während der RRMS dar. In vergangenen Studien konnte der positive Einfluss von IFN β und endogenem Typ I IFN auf den Verlauf der Krankheit bereits demonstriert werden. Bisher war es jedoch unmöglich die IFN β Produzenten auf Einzelzellebene zu identifizieren. Unter Verwendung des bicistronischen IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Reporter Mausmodells wurde daher die IFN β /YFP Expression während der EAE analysiert und visualisiert.

2.1.1 *In vitro* und *in vivo* Analyse der IFN β produzierenden Zellen während der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis

Zur Etablierung der EAE wurde initial der Verlauf der Erkrankung nach MOG₃₅₋₅₅ Immunisierung anhand des klinischen Scores dokumentiert.

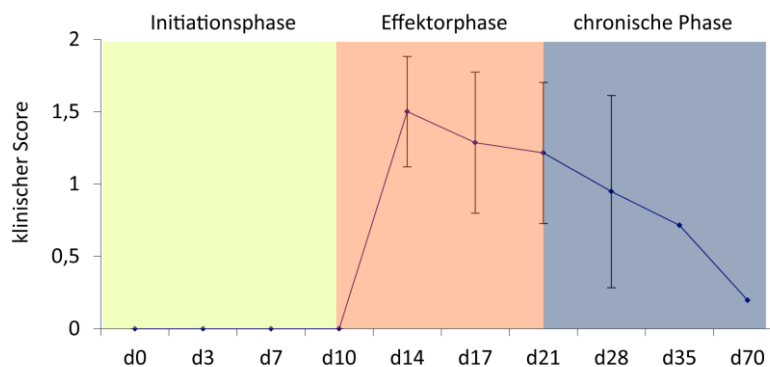


Abbildung 2.1 Definition der Phasen der EAE.

Wt Mäuse wurden MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und der Schweregrad der Lähmungen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

Die EAE beginnt mit der Initiationsphase in der die Immunantwort in der Peripherie abläuft, weshalb keine Lähmungen beobachtet werden konnten. Die anschließende Effektorphase beginnt mit der Einwanderung von Zellen des Immunsystems, und die ersten Lähmungen wurden sichtbar. Dies beginnt ca. an d10. Die Krankheit erreichte in dieser Phase zwischen d14 und d17 ihren Höhepunkt, was durch den höchsten klinischen Score widerspiegelt wurde. Schließlich setzt die chronische Phase ein, die zur vollständigen oder partiellen Regeneration führt und durch eine Verminderung des klinischen Scores charakterisiert war (s. Abb. 2.1). Die folgenden Experimente wurden am Höhepunkt der Krankheit oder zu den angegebenen Zeitpunkten in einer Kinetik durchgeführt.

2.1.1.1 Definition der intrazerebralen Zellpopulationen

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde das Reportermaussystem für IFN β /YFP *in vitro* und *in vivo* eingehend in verschiedenen Infektionsmodellen und nach Stimulation mit definierten molekularen Pathogenbestandteilen validiert (Dresing et al., 2010; Scheu et al., 2008). Der Fokus dieses Teiles der Arbeit bestand in der Definition und Lokalisierung IFN β /YFP produzierender Zellen im Krankheitsmodell der EAE. Um die Zellpopulationen im ZNS zu identifizieren, wurde eine Färbung der Oberflächenproteine CD11b und CD45 durchgeführt. CD11b wird in der Peripherie vor allem von APZs wie M Φ und DCs exprimiert, im ZNS aber auch von Mikroglia. CD45 wird von allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert, allerdings auch von residenter Mikroglia - die, wie bereits beschrieben von primitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen des Dottersacks abstammen – in geringerer Expressionsstärke (Sedgwick et al., 1991). Die simultane Färbung dieser beiden Oberflächenproteine im ZNS ermöglicht somit die Charakterisierung zwischen residenten und immigrierten Zellen hämatopoetischen Ursprungs und stellt die Grundlage der hier *in vivo* und *in vitro* durchgeführten Experimente dar (Abb. 2.2).

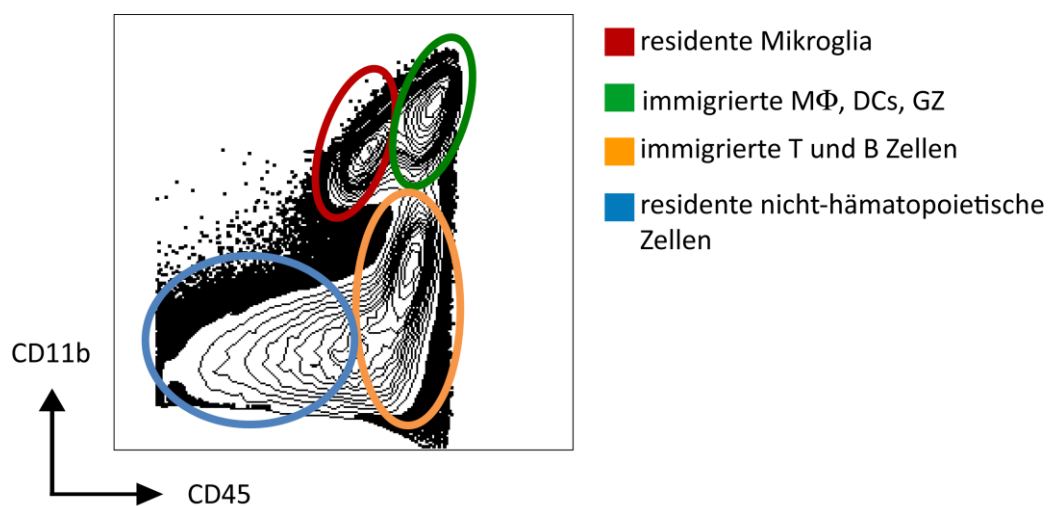


Abbildung 2.2 Einteilung der Zellpopulationen im ZNS

Beispielhaft dargestellt ist die FACS-Analyse der mittels Percoll-Gradient aufgereinigten intrazerebralen Zellpopulationen einer MOG₃₅₋₅₅ immunisierten Maus am Höhepunkt der Krankheit.

CD45⁻, CD11b⁻ Zellen setzen sich aus residenten, nicht-hämatopoetischen Zellen, wie z.B. Endothelzellen und Astrozyten zusammen. CD45⁺, CD11b⁻ Zellen stellen vor allem immigrierte T und B Zellen dar. CD45⁺, CD11b⁺ Zellen werden durch M Φ und DCs repräsentiert. Residente Mikroglia heben sich von diesen durch ihre intermediäre CD45 Expression ab und sind ebenfalls CD11b⁺ (Abb. 2.2).

2.1.1.2 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression auf Einzel-Zellebene in der Peripherie am Höhepunkt der Krankheit

Vorangehende Publikationen ließen den Schluss zu, dass IFN β am Höhepunkt der EAE exprimiert wird und einen protektiven Effekt auf den Verlauf der Krankheit ausübt (Prinz et al., 2008; Teige et al., 2003). Bisher wurde die Expression von IFN β nur für das gesamte Rückenmark und nicht zellspezifisch gezeigt. Daher sollte die IFN β Expression in einer Kinetik lokalisiert und die IFN β produzierenden Zellen in der Peripherie und dem ZNS verglichen werden.

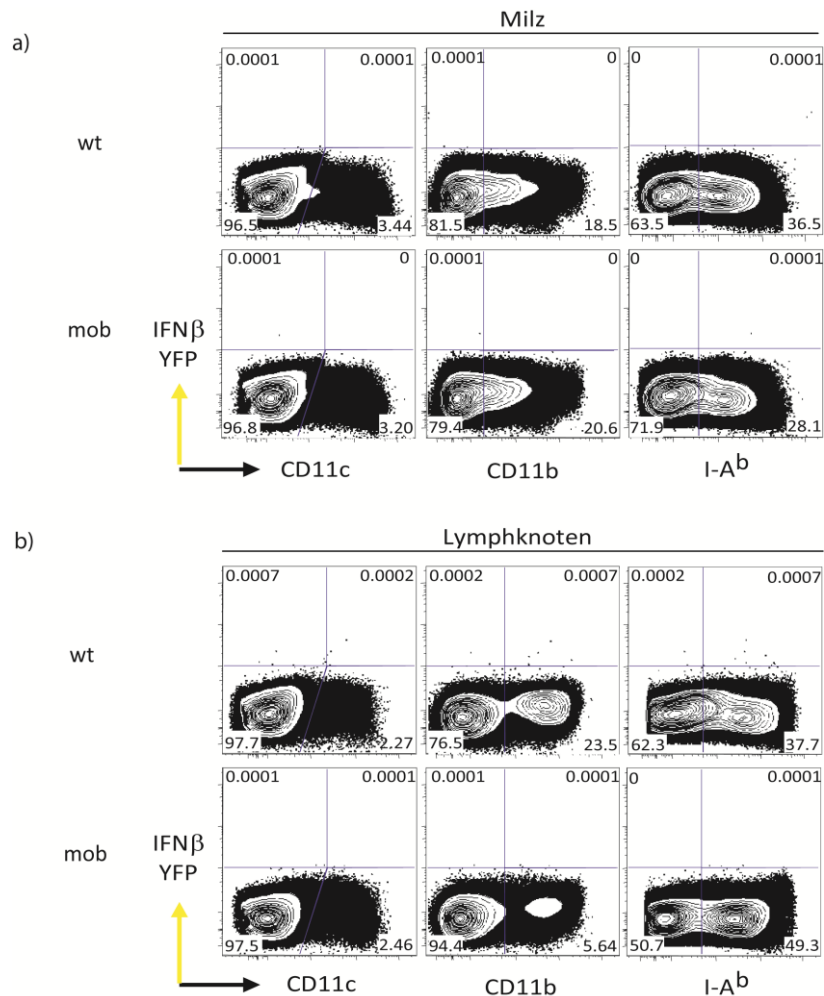


Abbildung 2.3 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression in der Milz und peripheren Lymphknoten am Höhepunkt der Krankheit.

IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ und IFN $\beta^{\text{wt/wt}}$ Mäuse wurden MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Sekundäre lymphatische Organe wurden an d17 nach Immunisierung analysiert. Die abgebildeten Zellen wurden auf lebende, DAPI⁺ und nicht-T und B Zellen gegatet. a) IFN β /YFP Expression in der Milz. b) IFN β /YFP in den peripheren Lymphknoten.

Die Analyse der IFN β /YFP Expression wurde zuerst an d17 nach Immunisierung untersucht, da hier die höchste IFN β /YFP Expression vermutet wurde. MOG₃₅₋₅₅ immunisierte IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäuse zeigten am Höhepunkt der Krankheit keine IFN β /YFP Expression in sekundären lymphatischen Organen, repräsentiert durch die Milz und die peripheren Lymphknoten (Abb. 2.3). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die IFN β /YFP Expression auch in der Induktions- und Regenerationsphase der Krankheit untersucht. Hier konnte ebenso keine IFN β /YFP Expression detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

2.1.1.3 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression auf Einzelzellebene im ZNS am Höhepunkt der Krankheit

Die Organe des ZNS wurden simultan zu den sekundären lymphatischen Organen isoliert und analysiert. Im Gegensatz zur Peripherie konnte im ZNS eine IFN β /YFP Expression detektiert werden. Die YFP Produzenten waren zum Großteil CD45^{int}, CD11b⁺, CD11c^{int} (s. Abb. 2.4a, b). Im Vergleich zum Gehirn wies das Rückenmark eine höhere Frequenz IFN β /YFP exprimierender Zellen auf (Abb. 2.4a-c). Im Rückenmark konnten von den durch den Percoll-Gradienten aufgereinigten Zellen ~0.1 % IFN β /YFP⁺ Zellen detektiert werden, während das Gehirn nur ~0,003 % IFN β /YFP⁺ Zellen aufwies. Die Berechnung der YFP produzierenden Zellen bezogen auf das gesamte Organ ergab eine Gesamtzellzahl von ca. 400 YFP⁺ Zellen pro Organ, während es nur ca. 50 Zellen für das Gehirn waren. Die Untersuchung von Rückenmark und Gehirn zeigte, dass residente Mikroglia die Hauptproduzenten von IFN β /YFP waren, da sie das für residente Mikroglia typische Expressionsprofil von Oberflächenmarkern aufwiesen. Sowohl im Rückenmark, als auch im Gehirn waren ca. 90 % der IFN β /YFP⁺ Zellen residente Mikroglia mit dem Oberflächenmarker-Expressionsprofil CD45^{int}, CD11b⁺, CD11c^{int}.

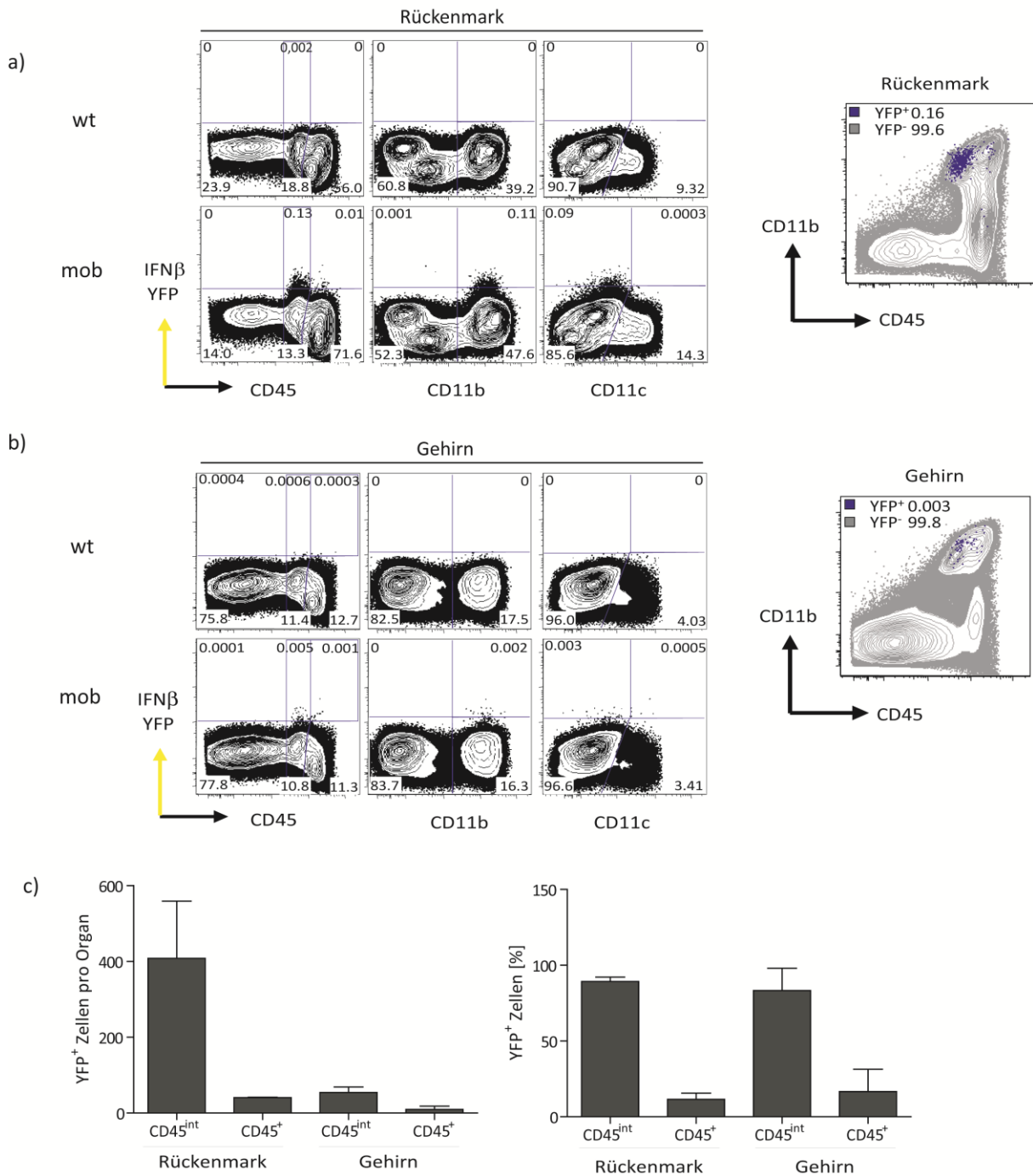


Abbildung 2.4 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression im ZNS am Höhepunkt der Krankheit
IFN β ^{mob/mob} und IFN β ^{wt/wt} Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Rückenmark und Gehirn wurden an d17 nach Immunisierung analysiert. a) IFN β /YFP Expression im Rückenmark und b) IFN β /YFP Expression im Gehirn von jeweils zwei gepoolten Mäusen. IFN β /YFP⁺ Zellen (blau) wurden den IFN β /YFP⁻ Zellen (grau) überlagert. c) Statistische Auswertung der IFN β /YFP produzierenden Zellen.

Somit konnte gezeigt werden, dass residente Mikroglia im Gehirn, aber vor allem im Rückenmark, die Hauptproduzenten von IFN β am Höhepunkt der Krankheit waren. Eine immunhistologische Detektion war aufgrund der niedrigen Zellzahlen und der hohen Autofluoreszenz im ZNS nicht möglich.

2.1.1.4 Analyse der IFN β -mRNS in sortierten Zellpopulationen des ZNS am Höhepunkt der Krankheit

Um die durchflusszytometrischen Ergebnisse bezüglich der Identität der IFN β /YFP produzierenden Zellen zu validieren, wurde die Expression der IFN β mRNS in den vier bereits beschriebenen (Abb. 2.2) FACS-sortierten Populationen bestimmt. Diese zeigten im Rückenmark (Abb. 2.4a) eine 140 fach höhere IFN β mRNS Expression relativ zu den CD45 $^-$, CD11b $^-$ Zellen, während es im Gehirn zu einer 13 fach höheren IFN β mRNS Expression kam. Immigrierte M Φ und DCs (CD45 $^+$, CD11b $^+$) wiesen nur eine geringe ca. 20 fache IFN β mRNS-Expression auf. Im Rückenmark wurde für CD45 $^+$, CD11b $^+$ Immigranten eine ca. 20 fach höhere Expression ermittelt, während diese im Gehirn das 7 fache betrug (s. Abb. 2.5).

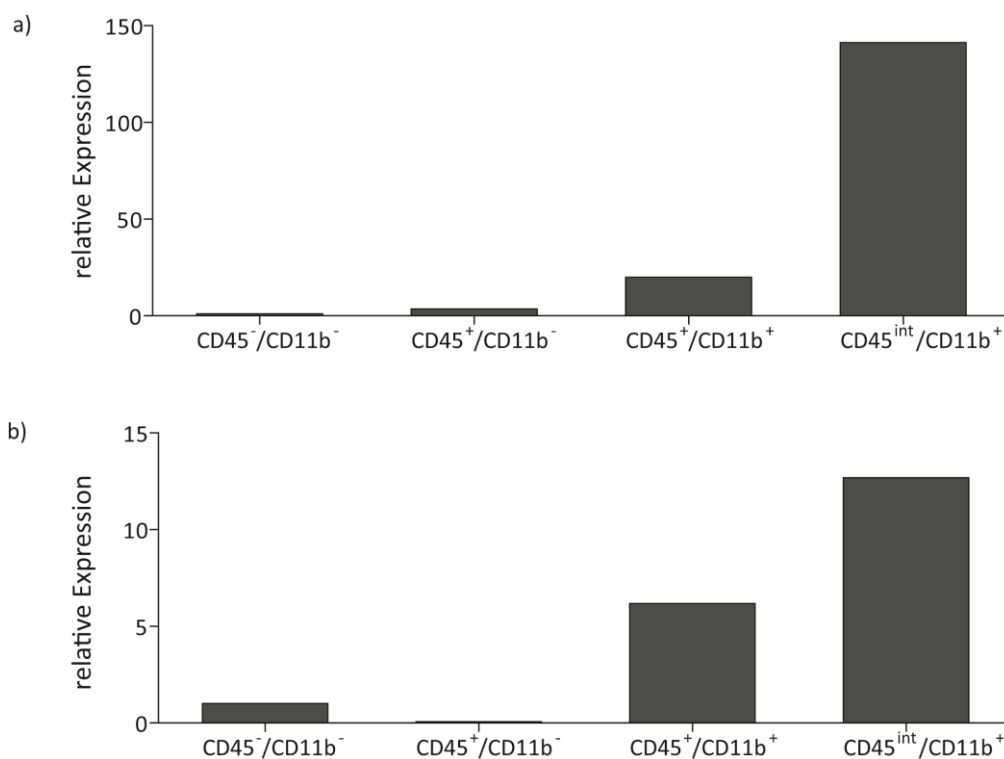


Abbildung 2.5 Analyse der IFN β mRNS-Expression in intrazerebralen Zellpopulationen am Höhepunkt der Krankheit.

Wt Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Zellen aus Rückenmark und Gehirn wurden isoliert und auf Grundlage ihrer CD11b und CD45 Expression FACS-sortiert. a) IFN β mRNS-Expression im Rückenmark. b) IFN β mRNS-Expression im Gehirn.

Die IFN β mRNS-Expressionsanalyse konnte die mittels FACS-Analyse erbrachten Ergebnisse zur Identität der IFN β /YFP Produzenten bestätigen. Beide Methoden konnten ZNS residente Mikroglia als Hauptproduzenten von IFN β am Höhepunkt der EAE identifizieren.

2.1.1.5 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression von Mikroglia aus EAE-induzierten Mäusen nach Stimulation mit definierten PAMPs

Residente Mikroglia sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie werden auch als die M Φ des ZNS bezeichnet, da sie M Φ ähnliche Funktionen ausführen. Die bereits dargestellten Ergebnisse bestätigen die Rolle der Mikroglia als wichtige Effektorzellen des Immunsystems, in dem sie IFN β als wichtigen immunregulatorischen Faktor produzieren. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob Mikroglia als Zellen des Immunsystems in der Lage sind, auf die Stimulation mit PAMPs am Höhepunkt einer EAE ebenfalls mit einer IFN β /YFP Produktion zu antworten und die vorherrschende autoimmune Inflammation möglicherweise zu beeinflussen. Dies basiert auf der Grundlage, dass die *in vivo* Stimulation mit TLR Liganden den Verlauf der EAE positiv oder negativ beeinflussen kann.

Intrazerebrale Leukozyten aus EAE induzierten Mäusen wiesen 24 h nach einer *ex vivo* Stimulation mit polyI:C die höchste Frequenz IFN β /YFP⁺ Zellen auf (0,64 %). CD45⁺ Zellen wiesen die höchste Anzahl IFN β /YFP⁺ Zellen auf (0,39 %), während CD45^{int} Zellen etwa ein Drittel der IFN β /YFP produzierenden Zellen darstellten (0,25 %). Nach der Restimulation mit MOG₃₅₋₅₅ wurden keine IFN β /YFP⁺ Zellen gemessen, während die Stimulation mit wobble DNS zu einer geringen IFN β /YFP Produktion in CD45⁻ und CD45⁺ Zellen führte ((0,04 % und 0,15 %) s. Abb. 2.6).

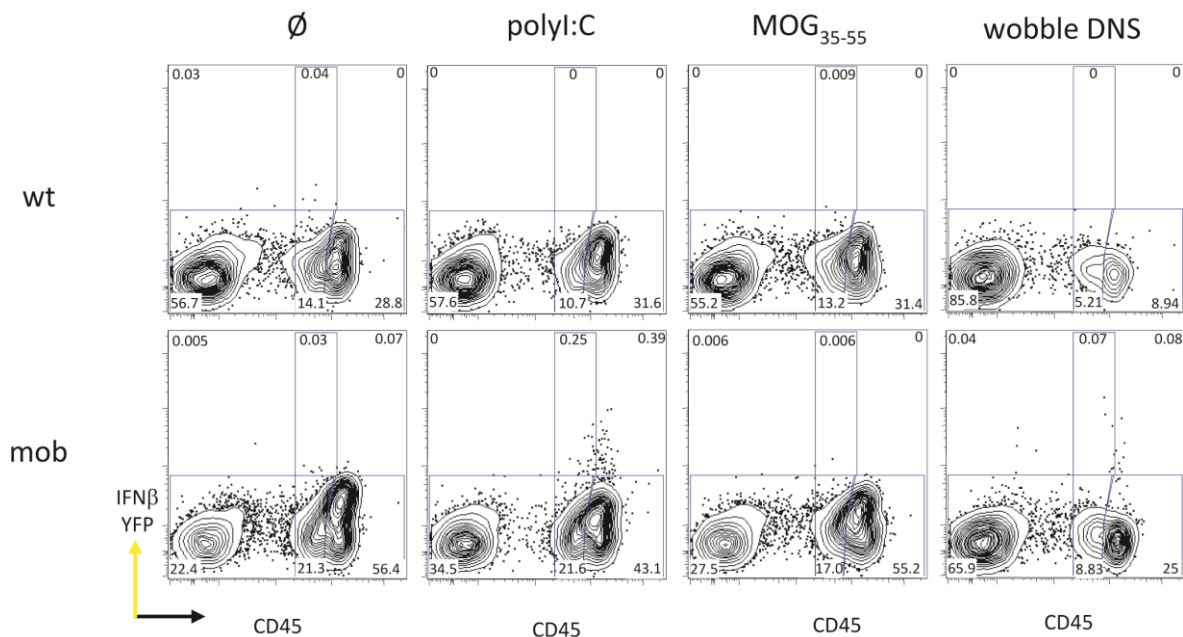


Abbildung 2.6 IFN β /YFP-Expression in *ex vivo* stimulierten intrazerebralen Leukozyten am Höhepunkt der Krankheit.

IFN β ^{mob/mob} und IFN β ^{wt/wt} Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Die am Höhepunkt der Krankheit isolierten intrazerebralen Zellen wurden für 24 h mit den jeweiligen PAMPs stimuliert. Gezeigt ist die IFN β /YFP Expression gegen CD45. Als Kontrolle für das Setzen der Analyse-Gates dienten Zellen von identisch behandelten IFN β ^{wt/wt} Mäusen.

Somit reagierten vor allem CD45⁺ Zellen auf die Stimulation mit PAMPs am Höhepunkt der Krankheit. Eine exakte Abgrenzung zwischen Mikroglia und immigrierten APZs jedoch war nur begrenzt möglich, da sich die Zellen *ex vivo* möglicherweise in ihrem Expressionsprofil der Oberflächenmarker leicht verändert haben könnten.

2.1.2 Charakterisierung der Immunantwort in der Peripherie und im ZNS im Verlauf der EAE

Eine bisherige Publikation zeigte eine IFN β Expression nur am Höhepunkt der EAE, jedoch nicht in den verschiedenen Phasen der Krankheit (Prinz et al., 2008). Im Folgenden eröffnete sich die Frage, wie sich die IFN β Expression im Verlauf der EAE verhält. Um diese Frage zu beantworten, wurde die IFN β mRNA Expression in einer Kinetik an 10 verschiedenen Zeitpunkten der EAE in Milz und peripheren Lymphknoten sowie Rückenmark und Gehirn mittels quantitativer Real Time PCR verglichen. Zusätzlich wurde die mRNA Expression von Genen analysiert, die im Kontext der EAE von großer Bedeutung sind und die Rahmenbedingungen für eine vorhandene IFN β Expression definieren.

2.1.2.1 Vergleich der IFN β mRNA Expression zwischen Peripherie und ZNS im Verlauf der EAE

In der Milz und den peripheren Lymphknoten konnte eine frühe IFN β mRNA Expression in der Initiationsphase der EAE nachgewiesen werden, die in der Effektorphase ihren Tiefpunkt erreichte, um in der chronischen Phase wieder anzusteigen (Abb. 2.7). Die höchste Expression konnte für die Milz an d3 nach Immunisierung gemessen werden (ca. 18 fach), während die Lymphknoten eine gleichbleibende Expression an d3 und d7 gegenüber dem basalen Wert aufwiesen (ca. 9 fach). Das Rückenmark zeigte einen Anstieg der IFN β Expression zu Beginn der Effektorphase an d10 (10 fach) und erreichte ihren Höhepunkt an d14 und d17 (40 fach). Ab d21 sank die Expression der IFN β mRNA rapide und stieg in der späten chronischen Phase wieder an (20 fach). Im Gehirn wurde ebenfalls ein Anstieg der IFN β mRNA an d10 verzeichnet. Die Höhepunkte der Expression wurden an d14 mit einem ca. 2,5 fachen und an d21 mit einem 4,5 fachen Anstieg der IFN β mRNA relativ zur naiven Kontrolle gemessen.

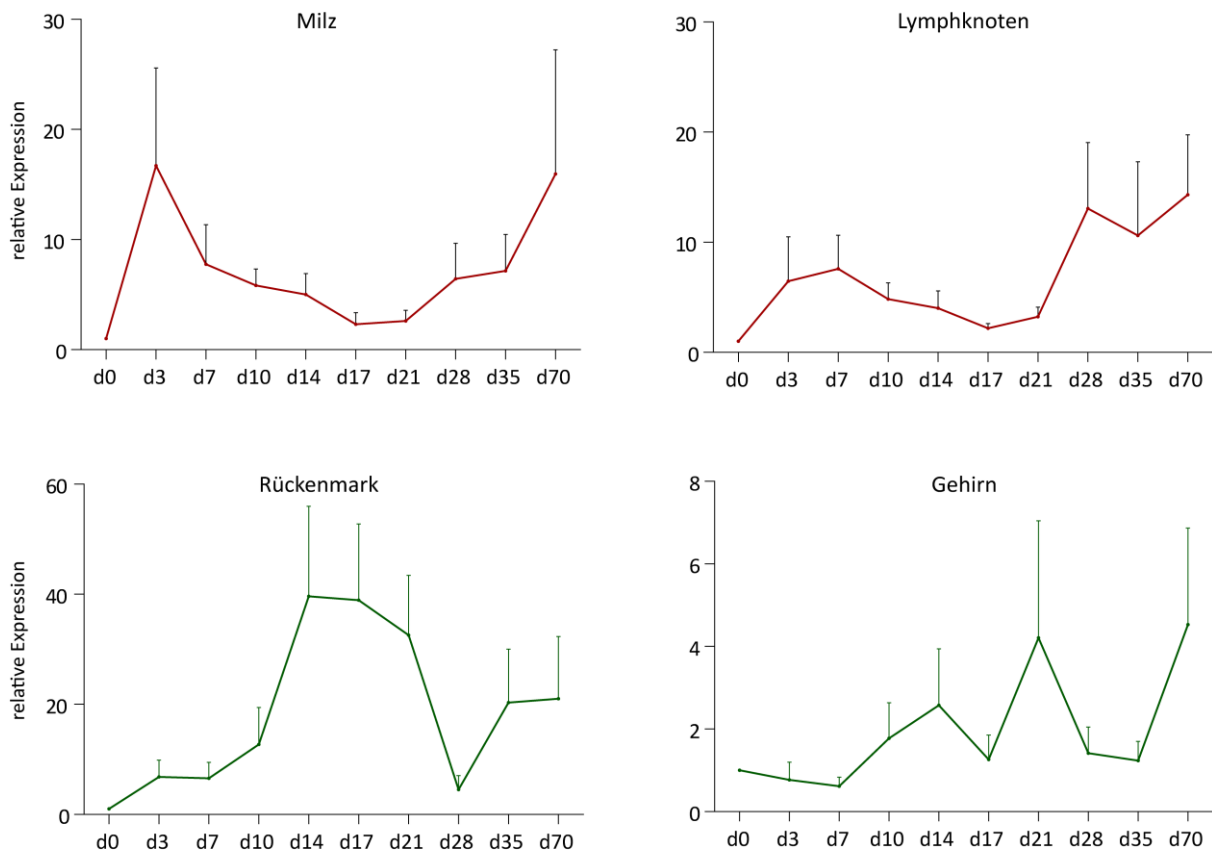


Abbildung 2.7 Vergleich der IFN β mRNA-Expression zwischen sekundären lymphatischen Organen und ZNS. 10 Wochen alte wt Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert oder naiv belassen. Die jeweiligen Organe wurden zu den angezeigten Zeitpunkten isoliert und mittels qRT-PCR auf IFN β mRNA-Expression hin analysiert. Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen von IFN β zur naiven Kontrolle der jeweiligen Organe. Insgesamt wurden 6 Tiere pro Organ und Zeitpunkt analysiert (n=6).

Zusammenfassend konnte eine gegenläufige Regulation der IFN β mRNA Expression zwischen den sekundären lymphatischen Organen und dem ZNS gezeigt werden. Während IFN β in der Peripherie in der Initiationsphase exprimiert wurde, wurde im ZNS eine Expression in der Effektorphase nachgewiesen.

2.1.2.2 Korrelation der IFN β mRNA Expression mit der Expression des Interferon stimulierten Gens ISG56

IFN β ist wie bereits beschrieben eines der ersten Zytokine, deren Expression während einer Immunantwort induziert wird, was in direkter Folge zu einer Induktion vieler IFN-stimulierter Gene führt. Die Induktion IFN-stimulierter Gene dient als indirektes Maß für die Stärke der IFN β Expression (Guo et al., 2000; Terenzi et al., 2007). Um die vorangehenden Ergebnisse zur IFN β mRNA Expression auf diese Weise zu bestätigen, wurden Milz und Rückenmark auf die Expression des IFN-stimulierten Gens ISG56 mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) hin analysiert.

In der Milz konnte in der frühen Initiationsphase an d3 eine sehr niedrige Induktion (2 fach) der ISG56 mRNA gemessen werden. Die ISG56 Expression im Rückenmark korrelierte eindeutig mit der Expression von IFN β (Abb. 2.8). An d3 wurde analog zur IFN β Expression ein leichter Anstieg der ISG56 mRNA detektiert, während die höchste Expression zwischen d14 und d21 der Krankheit gemessen werden konnte.

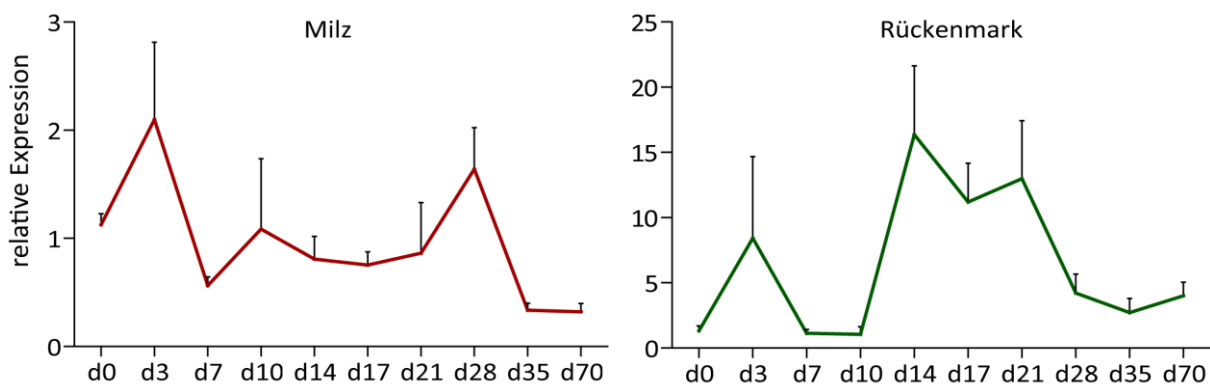


Abbildung 2.8 Analyse der ISG56 mRNA Expression im Verlauf der EAE

Die ISG56 mRNA Expression wurde mittels qRT-PCR in den Proben aus Abb. 3.6 bestimmt, um eine Korrelation zur IFN β mRNA zu ermöglichen. Insgesamt wurden 6 Tiere pro Organ und Zeitpunkt analysiert (n=6).

Die Analyse der ISG56 mRNA Expression korreliert vor allem im Rückenmark mit der Induktion von IFN β und bestätigt die hier ermittelten Daten für die IFN β Expression.

2.1.2.3 Charakterisierung der Immunantwort in Peripherie im Verlauf der EAE

Im weiteren Verlauf wurde die Expression für EAE relevante T Zell assoziierte Gene mittels qRT-PCR in Milz und Rückenmark bestimmt (Abb.2.9 + Abb.2.10), um die Bedingungen, unter denen IFN β exprimiert, wird näher zu beschreiben. Die EAE ist eine T Zell vermittelte autoimmune Reaktion gegen körpereigene Proteine der Myelinscheide der Neurone. Die Rolle, die T_H1 und T_H17 Zellen dabei als Krankheitsmediatoren spielen, ist umstritten, da keines ihrer Zytokinprofile essentiell für die Induktion der Krankheit ist (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011). Daher wurden T Zell- und vor allem T_H1- und T_H17-assoziierte Gene auf ihre Expression hin analysiert. In der Milz kam es bereits in der frühen Initiationsphase zu einer Abnahme der CD3 ϵ Expression und damit zu einer Abnahme der T Zellen, was unterschiedliche Ursachen haben kann. Während der Effektorphase, am Höhepunkt der Krankheit, kam es zu einem geringen Anstieg der CD3 ϵ Expression gefolgt von einer raschen Abnahme. Die Expression der Transkriptionsfaktoren für die erwähnten T Zell Subtypen zeigte in der Initiationsphase nur eine sehr geringe Abnahme und einen unterschiedlich hohen Anstieg in der Effektorphase, gefolgt von einem Absinken der Expression in der chronischen Phase. Foxp3 zeigte die höchste Expression in der Effektorphase. T-bet zeigte nur einen geringen Anstieg (2 fach). Für ROR γ t wurde der geringste Anstieg ermittelt. Die Expression der von T_H1 bzw. T_H17 exprimierten Zytokine IFN γ bzw. IL-17a zeigte eine Induktion in der Initiationsphase an d3 und d7. Auf diese folgend wurde nach einer Herunterregulation ein leichter Anstieg in der Expression während der Effektorphase gemessen, wobei IL-17a um das 100 fache höher exprimiert war als IFN γ . Für GM-CSF konnte keine deutliche Tendenz einer Regulation ermittelt werden. Die IL-23p19 Expression zeigte, wie auch IL-17a, zwei Maxima in der Initiationsphase und in der Effektorphase (s. Abb. 2.10). Somit konnte gezeigt werden, dass es in der Initiationsphase zu einem Absinken der T-Zell definierenden Gene CD3 ϵ , Foxp3, T-bet und ROR γ t kam, gefolgt von einem Anstieg in der Effektorphase. Dieses Expressionsmuster konnte bei den hier untersuchten Zytokinen größtenteils nachvollzogen werden.

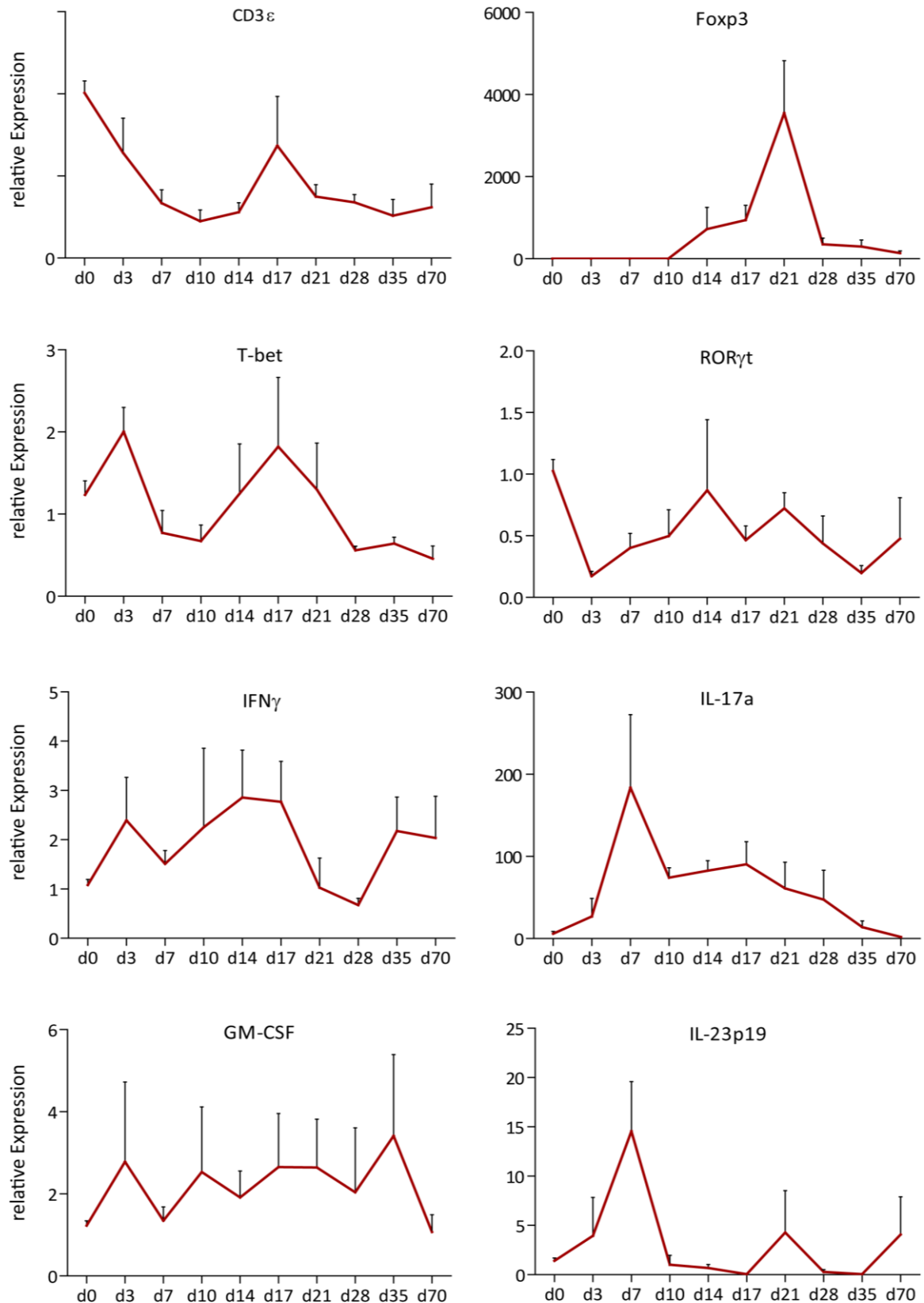


Abbildung 2.9 Charakterisierung der Immunantwort in der Milz im Verlauf der EAE. Die mRNA-Expression für die EAE relevanten Gene wurde zur Definition der immunologischen Antwort mittels qRT-PCR bestimmt (s. Abb. 2.6).

2.1.2.4 Charakterisierung der Immunantwort im ZNS im Verlauf der EAE

Analog zur Milz wurden die bereits oben beschriebenen Gene für das Rückenmark als wichtige Mediatoren der autoimmunen Reaktion im Verlauf der EAE analysiert (Abb. 2.10). Während CD3 ϵ mRNA in der Initiationsphase nicht nachweisbar war, konnte ein Anstieg der Expression in der Effektorphase der EAE mit Höhepunkten an d14 und d21 nachgewiesen werden. Dieser führte zu einem 80 bzw. 120 fachen Anstieg der mRNA-Expression, während ein Absinken in der chronischen Phase gemessen wurde. Dieses Expressionsmuster wurde für den T_H1 Transkriptionsfaktor T-bet mit einem 180 fachen und dem T_{reg} Transkriptionsfaktor FoxP3 mit einem 330 fachen Anstieg ebenfalls ermittelt. Eine Veränderung der Expression von ROR γ t konnte nicht nachgewiesen werden. Die Zytokine IFN γ und GM-CSF erreichten den Höhepunkt ihrer Expression an d14 mit einem 70 und 600 fachen Anstieg und waren an d17 bereits stark herunterreguliert. Für IL-17a hingegen wurde eine 5000 fache Expression für d14 und d17 mit einer folgenden Herunterregulation detektiert. Eine Expression von IL-23p19 konnte nicht nachgewiesen werden.

Die stattfindende Immunreaktion im Rückenmark war T-Zell vermittelt, wobei T_{regs}, T_H1 und T_H17 Zellen anwesend waren. Dies konnte durch die Expression der definierten Transkriptionsfaktoren und der dazugehörigen Zytokine gezeigt werden. Für eine T_H17 vermittelte Immunreaktion konnte nur die IL-17a Expression als Leitzytokin nachgewiesen werden. Somit waren sowohl T_H1 und T_H17 T Zellen als Mediatoren der autoimmunen Inflammation im Rückenmark anwesend. Die ebenfalls nachgewiesene GM-CSF Expression ergänzte das proinflammatorische Expressionsprofil.

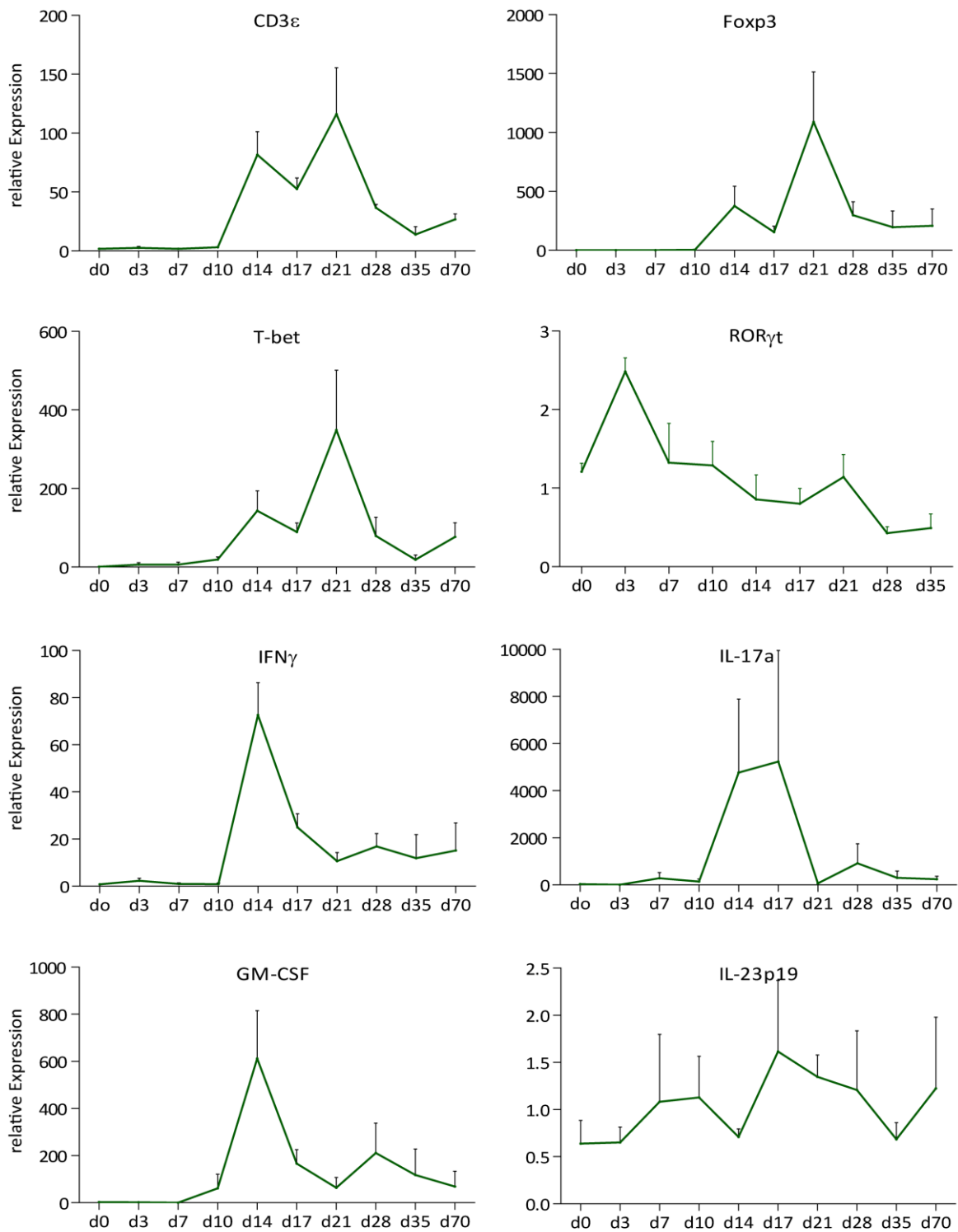


Abbildung 2.10 Charakterisierung der Immunantwort im Rückenmark im Verlauf der EAE. Die mRNA-Expression für die EAE relevanter Gene wurde zur Definition der immunologischen Antwort mittels qRT-PCR bestimmt (s. Abb. 2.6).

2.1.3 Charakterisierung der IFN β /YFP Expression im ZNS nach Stimulation mit definierten PAMPs *in vitro* und *in vivo*

Bisher publizierte Daten belegen, dass Mikroglia in der Lage sind, IFN β zu exprimieren. Aufgrund der Expression verschiedener TLRs können sie durch verschiedene PAMPs wie polyI:C und LPS aktiviert werden. Dies führte zu einer Heraufregulation der IFN β mRNA (Town et al., 2006). Weiterhin konnte während einer Infektion mit einem neurotrophen Virus eine IFN β Produktion in Neuronen gezeigt werden (Delhaye et al., 2006). Die hier gezeigten Versuche konnten erstmals Mikroglia als Hauptproduzenten von IFN β während der EAE und damit einer autoimmunen Inflammation identifizieren. Um diese Zellpopulation näher auf ihre Funktion als IFN β -produzierende Zellen nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs hin zu untersuchen, wurden diese *in vitro* und *in vivo* stimuliert. Anschließend wurde die IFN β /YFP Produktion auf Einzelzellebene analysiert und dargestellt.

2.1.3.1 Charakterisierung der IFN β /YFP Produzenten im ZNS nach *ex vivo* Stimulation mit PAMPs

Die Stimulation intrazerebraler Zellpopulationen aus naiven IFN $\beta^{wt/wt}$ und IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen mit den PAMPs polyI:C und LPS konnte mittels FACS-Analyse zeigen, dass CD45^{int}, CD11b⁺ Zellen IFN β /YFP produzierten (Abb. 2.11). Bei diesen Zellen handelt es sich um Mikroglia, da sie unter naiven Bedingungen als einzige bekannte Zellpopulation CD45 im ZNS exprimieren. Die Stimulation durch polyI:C induzierte eine höhere IFN β /YFP Produktion (0,11 %) im Vergleich zu LPS (0,02 %).

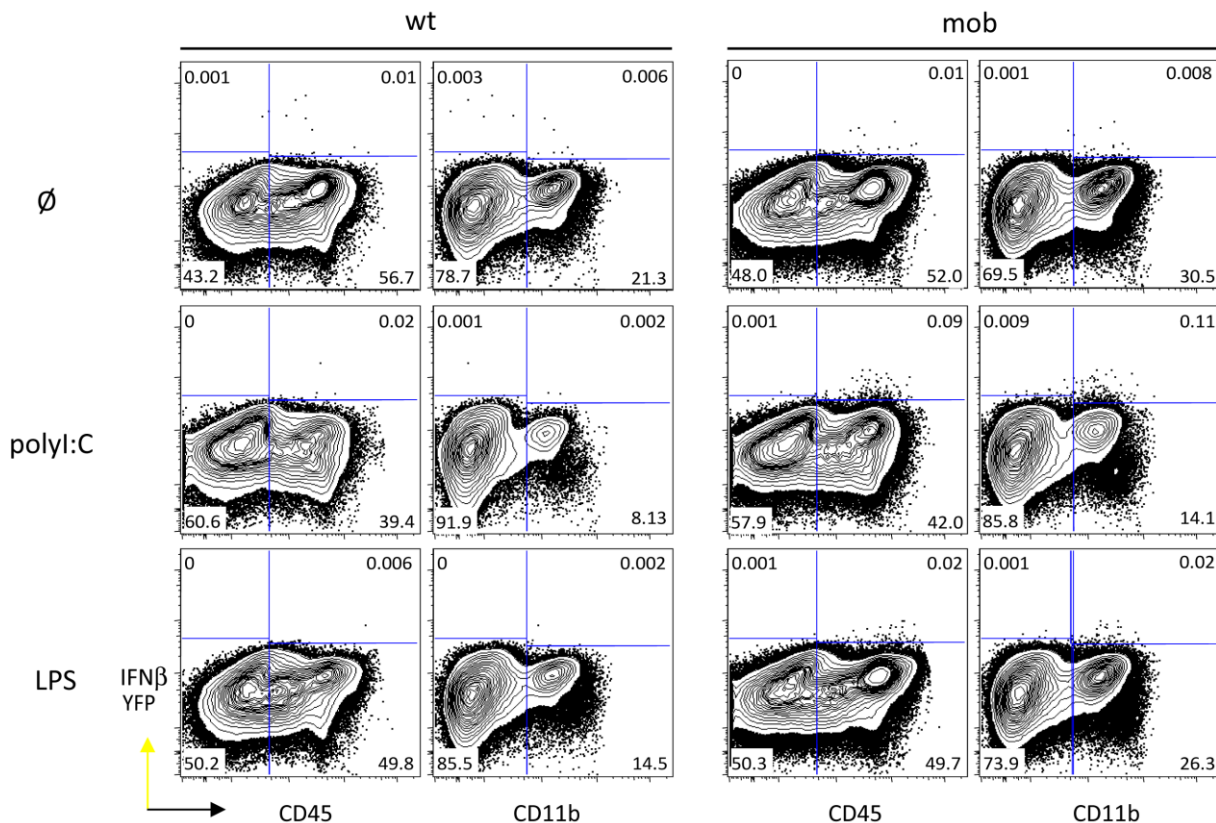


Abbildung 2.11 IFN β /YFP-Expression in naiven *ex vivo* stimulierten intrazerebralen Zellpopulationen 24 h nach Stimulation.

Intrazerebrale Zellpopulationen von IFN $\beta^{mob/mob}$ und IFN $\beta^{wt/wt}$ Mäusen wurden für 24 h mit den TLR-Liganden polyI:C (50 μ g/ml) und LPS (100 ng/ml) stimuliert. Gezeigt ist die IFN β /YFP Expression auf Einzelzellebene nach Stimulation. IFN $\beta^{wt/wt}$ Mäuse dienten als Kontrolle für das Setzen der Analyse-Gates.

Somit zeigte die *ex vivo* Stimulation naiver, mittels Percoll-Gradient aufgereinigter, intrazerebraler Leukozyten auf Einzelzellebene, dass Mikroglia auch nach Stimulation mit PAMPs die in der Lage sind IFN β /YFP zu exprimieren.

2.3.2 Charakterisierung und Lokalisierung der IFN β /YFP Expression nach intrathekaler polyI:C Stimulation

Um eine virale zerebrale Infektion *in vivo* zu simulieren und eine starke IFN β Antwort zu induzieren, wie sie z.B. durch das West Nile Virus verursacht wird, wurden IFN $\beta^{wt/wt}$ und IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäuse intrathekal mit dem dsRNA Analogon polyI:C stimuliert und die IFN β /YFP exprimierenden Zellen analysiert.

Erneut erwiesen sich CD45^{int}, CD11b⁺, CD11c^{int} Mikroglia als die Hauptproduzenten von IFN β /YFP (Abb.2.12a, b). Zusätzlich zeigten CD45⁺, CD11b⁺, CD11c^{int} Zellen eine geringe IFN β /YFP Expression. Die als Mikroglia identifizierte Population stellte 0,37 % der Gesamtzellen dar, während die IFN β /YFP⁺ CD45⁺ Immigranten nur 0,07 % ausmachten.

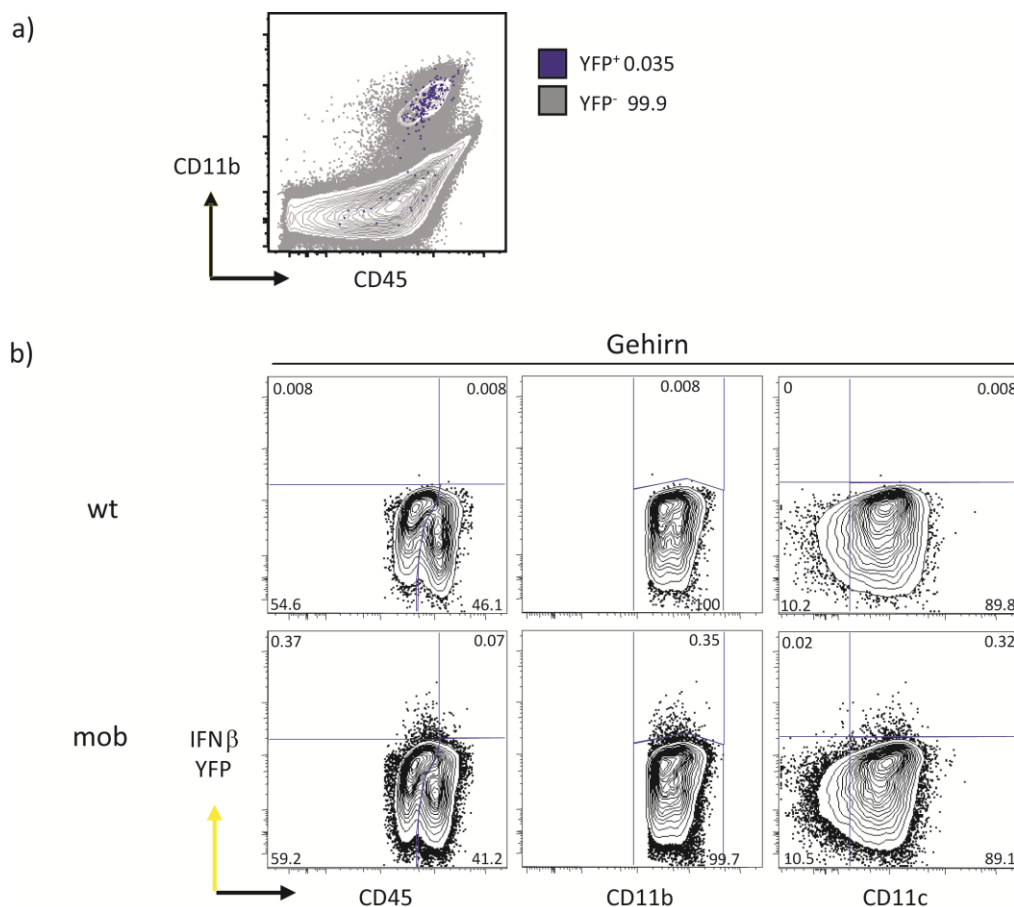


Abbildung 2.12 IFN β /YFP-Expression 24 h nach intrathekaler polyI:C Stimulation in intrazerebralen Zellpopulationen des Gehirns.

IFN $\beta^{mob/mob}$ und IFN $\beta^{wt/wt}$ Mäusen wurden intrathekal 6 μ g polyI:C verabreicht. 24 h nach Stimulation wurde die IFN β /YFP Expression im Gehirn mittels FACS analysiert. IFN $\beta^{wt/wt}$ Mäuse dienten als Kontrolle für das Setzen der Analyse-Gates. a) IFN β /YFP⁺ Zellen (blau) wurden den IFN β /YFP⁻ Zellen (grau) überlagert. b) IFN β /YFP⁺ Expression CD45^{int/+}, CD11b⁺ Zellen im Gehirn.

Weiterhin konnte die Lokalisation der IFN β /YFP Produzenten mittels Immunhistochemie nach intrathekaler polyI:C Injektion in einen der beiden Lateralventrikel bestimmt werden. Die YFP produzierenden Zellen wurden 24 h nach intrathekaler polyI:C Stimulation im den 4. Ventrikel umgebenden Gewebe des Gehirns lokalisiert. Die YFP⁺ Zellen waren morphologisch rundlich bis oval

mit kurzen dendritischen Ausläufern, wie sie für aktivierte Mikroglia charakteristisch sind (Perry., H. *Microglia and Macrophages* aus *Immunology of the Nervous System*, Seiten 157-159).

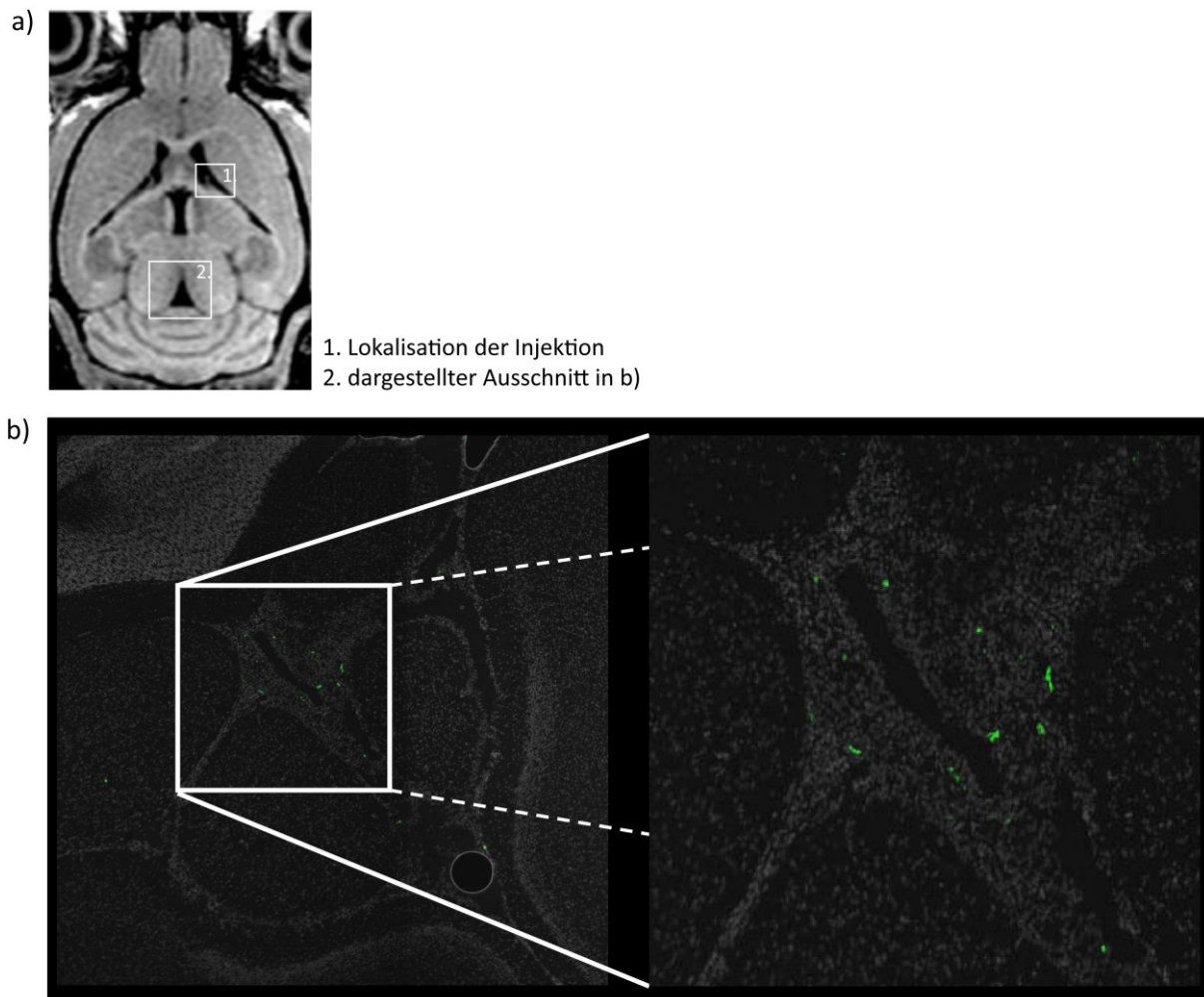


Abbildung 2.13 Lokalisation der IFN β /YFP exprimierenden Zellen nach intrathekaler polyI:C Stimulation.

a) Ausgewählte Ebene einer MRT-Aufnahme eines Maus-Gehirns zur Lokalisierung der Injektionsstelle und des in b) gezeigten Ausschnitts des Gehirns. Modifiziert nach: (Frahm, 2007), letzter Aufruf: 7.11.2012

b) Lokalisation der IFN β /YFP⁺ Zellen. IFN β ^{mob/mob} und IFN β ^{wt/wt} Mäusen wurden 6 μ g polyI:C intrathekal injiziert. YFP⁺ Zellen wurden in Kryoschnitte in der Horizontalebene von Gehirnen mit einem kreuzreagierenden, polyklonalen α -GFP Serum detektiert. Die Signale wurden mit Tyramid-FITC für YFP verstärkt. Nuklei wurden mittels DAPI visualisiert (graue Färbung). Als Färbekontrollen dienten identisch behandelte IFN β ^{wt/wt} Mäuse.

Mittels FACS-Analyse und Immunhistochemie konnten in IFN β ^{mob/mob} Mäusen Mikroglia auf Einzel-Zellebene als alleinige IFN β /YFP Produzenten nach Stimulation mit polyI:C bzw. LPS identifiziert werden.

2.3.3 Etablierung einer primären Mikroglia-Kultur aus der adulten Maus

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine primäre Mikroglia-Kultur aus Gehirn und Rückenmark der adulten Maus in Anlehnung an Ponomarev *et al.*, etabliert werden. Die *in vitro* Mikroglia aus IFN β ^{wt/wt} und IFN β ^{mob/mob} Mäusen wurden analog zur *in vivo* Situation mit PAMPs stimuliert, um zu überprüfen, ob diese in der Lage waren IFN β /YFP zu produzieren.

Die *in vitro* Mikroglia-Kultur zeigte für alle aufgezählten Ansätze an d14 eine 99 %ige Reinheit der kultivierten Zellen. Diese waren CD45⁺ und CD11b⁺ (Abb. 2.14a). Zusätzlich wurde zwischen Mikroglia aus Gehirn und Rückenmark unterschieden (2.14b, c). Die aus dem Gehirn kultivierte Mikroglia zeigte nach polyI:C, CpG2216 und wobble DNS Stimulation eine ca. 50 % geringere Frequenz IFN β /YFP⁺ Zellen im Vergleich zur Mikroglia aus dem Rückenmark. Im Gehirn waren nach polyI:C Stimulation 0,81 % der Zellen IFN β /YFP⁺, 0,01 % nach CpG2216 Stimulation. Die höchste Anzahl IFN β /YFP⁺ Zellen konnte nach der Stimulation mit wobble DNS mit 2,68 % gemessen werden. Im Rückenmark hingegen wurden 1,67 % IFN β /YFP⁺ Zellen nach polyI:C Stimulation und 0,3 % nach CpG2216 Stimulation gemessen. Auch hier induzierte die wobble DNS die höchste IFN β /YFP Antwort mit 5,14 %.

Somit konnte eine *in vitro* Mikroglia-Kultur aus der adulten Maus erfolgreich etabliert werden. Bezugnehmend auf die IFN β /YFP Expression ist es sinnvoll die Mikroglia aus dem Rückenmark zu generieren, da hier eine höhere Induktion der IFN β /YFP Expression nach der Stimulation verschiedener PAMPs gemessen werden konnte. Die primäre Mikroglia-Kultur soll in Zukunft der funktionalen Charakterisierung IFN β /YFP⁺ Mikroglia dienen.

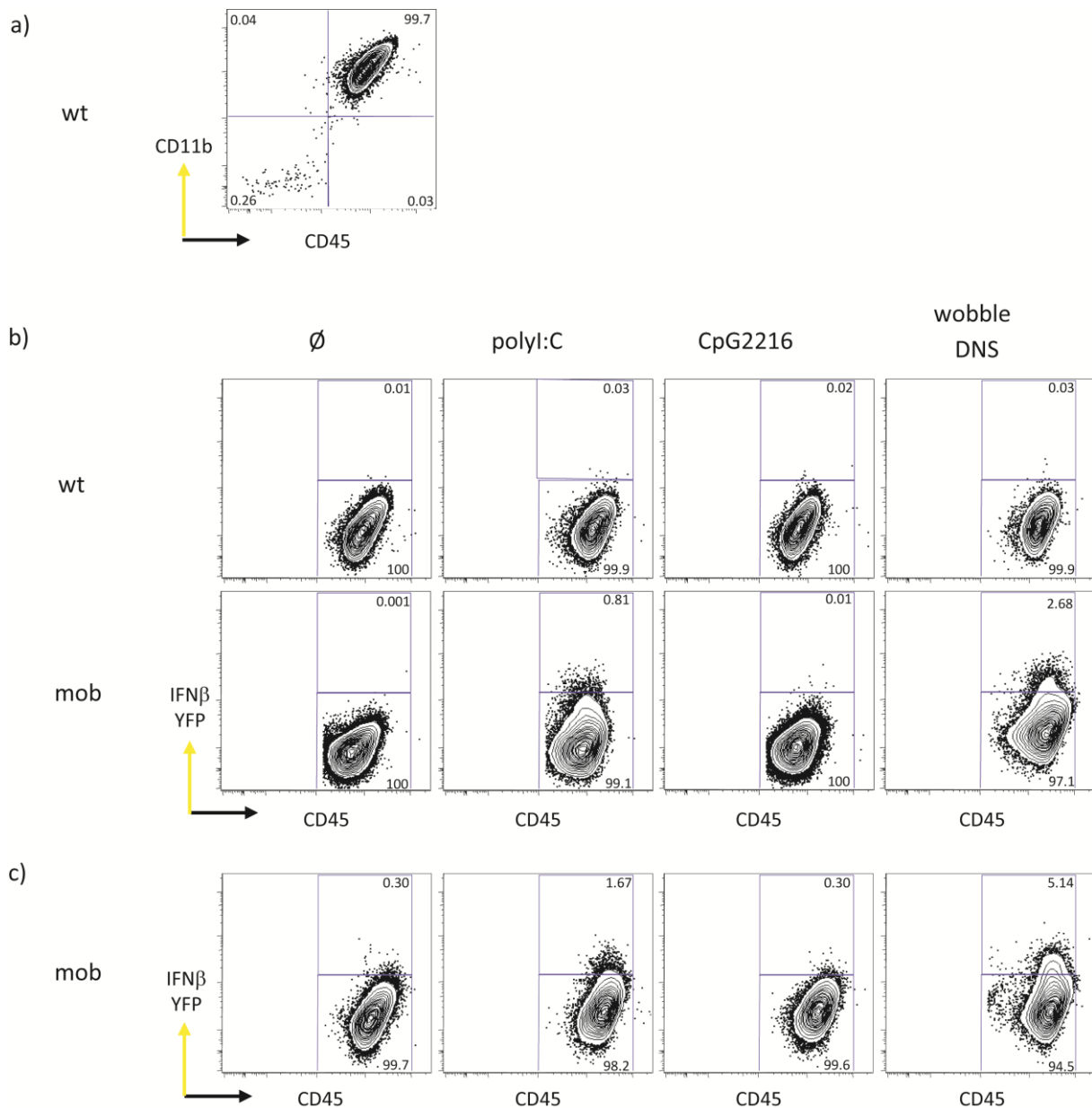


Abbildung 2.14 IFN β /YFP Expression in adulter Mikroglia nach Stimulation mit definierten PAMPs. Adulte Mikroglia wurde von IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ und IFN $\beta^{\text{wt/wt}}$ aus intrazerebralen Leukozyten nach Protokoll generiert und an d14 für 24 h mit den jeweiligen TLR Agonisten stimuliert. a) Dargestellt sind die Marker CD45 gegen CD11b aus dem Gehirn zur Definition der Reinheit der Kultur. IFN β /YFP Expression nach polyI:C, CpG2216 und wobble DNS Stimulation in aus dem Gehirn b) und aus dem Rückenmark c) generierter Mikroglia.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Mikroglia, eine ZNS residente Zellpopulation des angeborenen Immunsystems mit myeloidem Ursprung, während einer autoimmunen Reaktion im Modell der EAE die Hauptproduzenten von IFN β /YFP im ZNS waren. Dies konnte sowohl direkt auf Einzellzebene mittels FACS-Analyse, als auch indirekt mittels Analyse der mRNA-Expression in den verschiedenen Populationen des ZNS, basierend auf ihrem Expressionsprofil der Oberflächenmarker CD45 und CD11b nachgewiesen werden. Weiterhin wurden Erkenntnisse zur IFN β mRNA Expression im Verlauf der EAE gewonnen. Hier war IFN β während der Initiationsphase in der Peripherie exprimiert, während es gegenläufig dazu in der Effektorphase im ZNS exprimiert wurde. Die

Immunantwort, die während der Expression von IFN β vorherrschte, war proinflammatorisch.

Ergänzend zur IFN β /YFP Expression während der EAE wurde die IFN β /YFP Expression im ZNS nach Stimulation mit polyI:C untersucht. Auch hier wurde die IFN β /YFP Expression erstmals auf Einzelzellebene mittels FACS-Analyse in Mikroglia nachgewiesen. Die *ex vivo* Restimulation und die Stimulation *in vitro* generierter Mikroglia konnte ebenfalls residente Mikroglia als IFN β /YFP produzierende Zellen verifizieren.

2.2 Untersuchung der IFN β Expression und seiner Bedeutung in der Polymikrobiellen Peritonitis im Kontext einer viralen Infektion

Die polymikrobielle Peritonitis stellt ebenfalls wie die EAE eine komplexe Erkrankung dar, in der IFN β und das Typ I IFN System eine wichtige Rolle spielen. Im Kontext der polymikrobiellen Peritonitis konnte gezeigt werden, dass die IFN β und IFNAR Expression meist einen detrimentalen Effekt auf den Verlauf der Krankheit vermitteln. Wenige Daten liegen aber auch über einen positiven Effekt des Typ I IFN Systems auf die polymikrobielle Peritonitis vor. Die widersprüchlichen Ergebnisse können auf die Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Induktion der polymikrobiellen Peritonitis zurückgeführt werden.

In diesem Teil der Arbeit wurde die Relevanz einer viralen Infektion und der damit verbundenen IFN β Induktion auf die polymikrobielle Peritonitis, sowie die Quelle von IFN β nach CASP-OP untersucht.

2.2.1 Untersuchung der Auswirkungen einer akuten Virusinfektion auf den Verlauf einer polymikrobiellen Peritonitis

Der Verlauf einer polymikrobiellen Peritonitis wird durch unterschiedliche Parameter beeinflusst. So haben humorale Faktoren, wie Zytokine und Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. Granulozyten, eine hohe Relevanz für den Ausgang einer polymikrobiellen Peritonitis. Kommt es zum Ausfall einer dieser wichtigen Komponenten, die die Immunantwort wesentlich mitbestimmen, kann dies detrimental, aber auch protektive Effekte mit sich bringen. Weiterhin können parallel ablaufende Immunantworten Einfluss haben. In den folgenden Experimenten sollten die Auswirkungen einer akuten Virusinfektion, die durch polyI:C nachgestellt wurde, auf das Überleben einer polymikrobiellen Peritonitis und die einhergehenden Veränderungen der bakteriellen Last, der Effektorzell-Infiltration und Zytokinproduktion untersucht werden.

2.2.1.1 Relevanz der IFN β und IFNAR Expression für das Überleben nach CASP-OP im Verlauf einer akuten Virusinfektion

Für IFNAR $^{-/-}$ Mäuse im Kontext der CASP konnte bereits ein Vorteil im Überleben nachgewiesen werden (Weighardt et al., 2006). Bisherige Studien ließen offen, welche Relevanz die IFN β Expression in der polymikrobiellen Peritonitis nach CASP-OP spielt.

Im Folgenden wurde das Überleben in C57Bl/6 wt, IFN $\beta^{-/-}$ und IFNAR $^{-/-}$ Mäusen nach CASP-OP im Kontext einer Virusinfektion untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss der IFN β und IFNAR Expression auf den Verlauf der CASP in unbehandelten Mäusen untersucht. Im Verlauf der CASP zeigten wt Mäuse gegenüber IFN $\beta^{-/-}$ und IFNAR $^{-/-}$ Mäusen eine signifikant niedrigere Überlebenszeit (wt vs. IFN $\beta^{-/-}$ $p=0,0065$; wt vs. IFNAR $^{-/-}$ $p=0,0289$). So konnte bei wt Mäusen eine 50 %ige Überlebensrate nach ca. 24 h, bei IFN $\beta^{-/-}$ Mäusen nach ca. 36 h und bei IFNAR $^{-/-}$ Mäusen nach ca. 42 h beobachtet werden. Beim Vergleich der Überlebenszeiten der IFN $\beta^{-/-}$ und IFNAR $^{-/-}$ Mäuse konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,7183$) (s. Abb. 2.15a).

Im Verlauf einer akuten Virusinfektion, die durch die Stimulation mit 20 μ g polyI:C simuliert wurde, zeigten nur IFNAR $^{-/-}$ Mäuse eine signifikant längere Überlebenszeit verglichen mit wt Mäusen ($p=0,0152$). Im Gegensatz dazu zeigten IFN $\beta^{-/-}$ Mäuse einen mildereren, jedoch keinen signifikant schwächeren Verlauf der CASP ($p=0,0810$). Untereinander verglichen zeigten IFN $\beta^{-/-}$ und IFNAR $^{-/-}$ Mäuse erneut keinen signifikanten Unterschied im Überleben ($p=0,1269$; Abb. 2.15b). Die 50 %ige Überlebensrate zeigte ähnliche Werte wie in Abb. 2.15a beschrieben. Schließlich wurde die Relevanz von IFN β und des IFNAR nach einer Vorstimulation mit 200 μ g polyI:C und damit der Induktion einer starken Typ I IFN Antwort untersucht. Hier zeigten sowohl IFN $\beta^{-/-}$ und IFNAR $^{-/-}$ Mäuse signifikant längere Überlebenszeiten gegenüber wt Mäusen (wt vs. IFN $\beta^{-/-}$ $p=0,0017$; wt vs. IFNAR $^{-/-}$ $p=0,0004$). Während alle wt Mäuse bereits nach 24 h verstorben waren, lebten IFN $\beta^{-/-}$ bis zu 43 h und IFNAR $^{-/-}$ Mäuse überlebten zu 50 %.

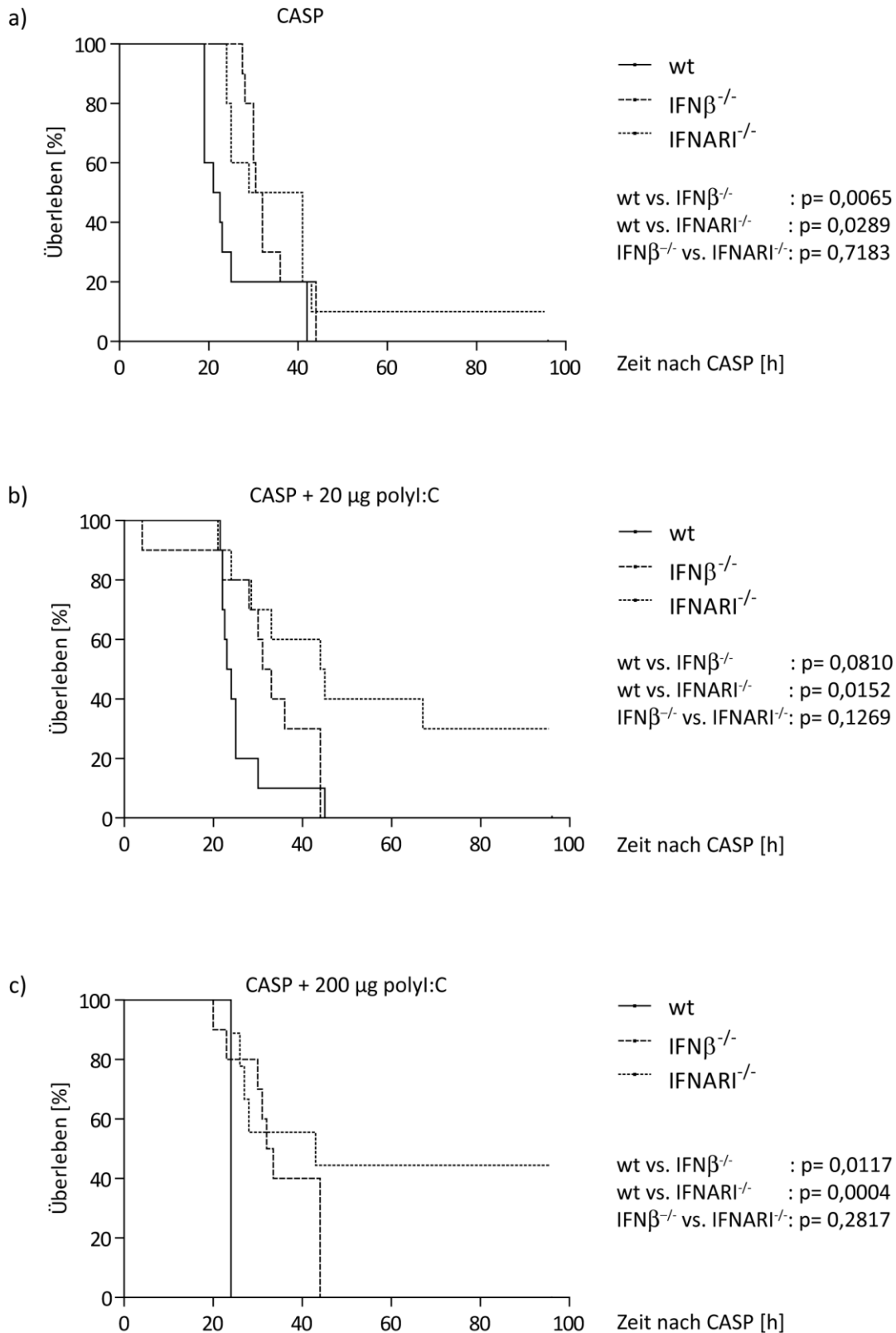


Abbildung 2.15 Relevanz von IFN β und des IFNAR für das Überleben nach CASP-OP im Kontext einer viralen Infektion.

C57Bl/6 wt, IFN β ^{-/-} und IFNARI^{-/-} Mäuse wurden a) unstimuliert belassen, b) mit 20 μ g polyI:C oder c) 200 μ g polyI:C für 24 h stimuliert. Anschließend wurde die CASP-OP mit der Stentgröße 14G durchgeführt und die Überlebenszeit bestimmt. (n=10 für alle Genotypen)

Diese Ergebnisse lassen somit den Schluss zu, dass IFN β in der Vermittlung einer detrimetellen Typ I IFN Antwort in der CASP eine Rolle spielt. Die Abwesenheit von IFN β führte zu einem signifikant längeren Überleben in CASP operierten Mäusen ohne und mit viraler Vorstimulation. Trotz nicht signifikanter Unterschiede in den Überlebenszeiten der IFN $\beta^{-/-}$ und IFNARI $^{-/-}$ Mäuse konnte der Vergleich der IFNAR $^{-/-}$ Mäuse mit wt Mäusen zeigen, dass IFN β vor allem nach polyI:C Stimulation z. T. redundant zu sein scheint, da IFNARI $^{-/-}$ Mäuse höhere Signifikanzen gegenüber dem wt zeigten als IFN $\beta^{-/-}$ Mäuse.

2.2.1.2 Einfluss von IFN β und des IFNARI auf die bakterielle Last im Verlauf einer akuten Virusinfektion

Das signifikant bessere Überleben der IFN $\beta^{-/-}$ und IFNARI $^{-/-}$ gegenüber wt Mäusen ließ den Schluss zu, dass die Abwesenheit von IFN β bzw. des Typ I IFN Systems einen Überlebensvorteil in der CASP und während einer akuten viralen Infektion bietet. Die Bestimmung der bakteriellen Last als wichtigen Parameter, sollte die Frage klären, ob das bessere Überleben auf einer niedrigeren bakteriellen Last und damit einer verminderten bakteriellen Ausbreitung basiert. Hierzu wurde die bakterielle Last 12 h nach CASP-OP in der Peritonealhöhle, dem Ort des septischen Fokus und der Milz, als anatomisch unbeteiligtem Organ von wt, IFN $\beta^{-/-}$ und IFNARI $^{-/-}$ Mäusen bestimmt. Die Bestimmung der bakteriellen Last in der Milz lässt somit Schlüsse über eine systemische Ausbreitung und eine Septikämie zu.

Der Vergleich der Genotypen untereinander nach CASP oder kombinierter polyI:C Stimulation und CASP konnte keine signifikanten Unterschiede in der bakteriellen Last zeigen (Daten nicht gezeigt). Weiterhin zeigte der Vergleich der bakteriellen Last nach CASP oder nach polyI:C Stimulation mit CASP nur in der Peritonealhöhle der IFN $\beta^{-/-}$ Mäuse einen signifikanten Unterschied ($p=0,0310$; Abb. 2.16b). Die Milz zeigte ebenfalls einen deutlichen, jedoch keinen signifikanten Anstieg zwischen CASP allein und kombinierter polyI:C Stimulation und CASP ($p=0,0525$). Wt Mäuse zeigten eine leichte, jedoch keine signifikante Erhöhung in der bakteriellen Last in der Peritonealhöhle und der Milz (Peritonealhöhle $p=0,2005$; Milz: $p=0,1074$; Abb. 2.16a). Im Gegensatz dazu zeigten IFNARI $^{-/-}$ Mäuse weder in der Peritonealhöhle noch in der Milz eine Erhöhung der bakteriellen Last nach CASP durch eine polyI:C induzierte Typ I IFN Antwort (Peritonealhöhle $p=0,8830$; Milz $p=0,4256$; Abb. 2.16c).

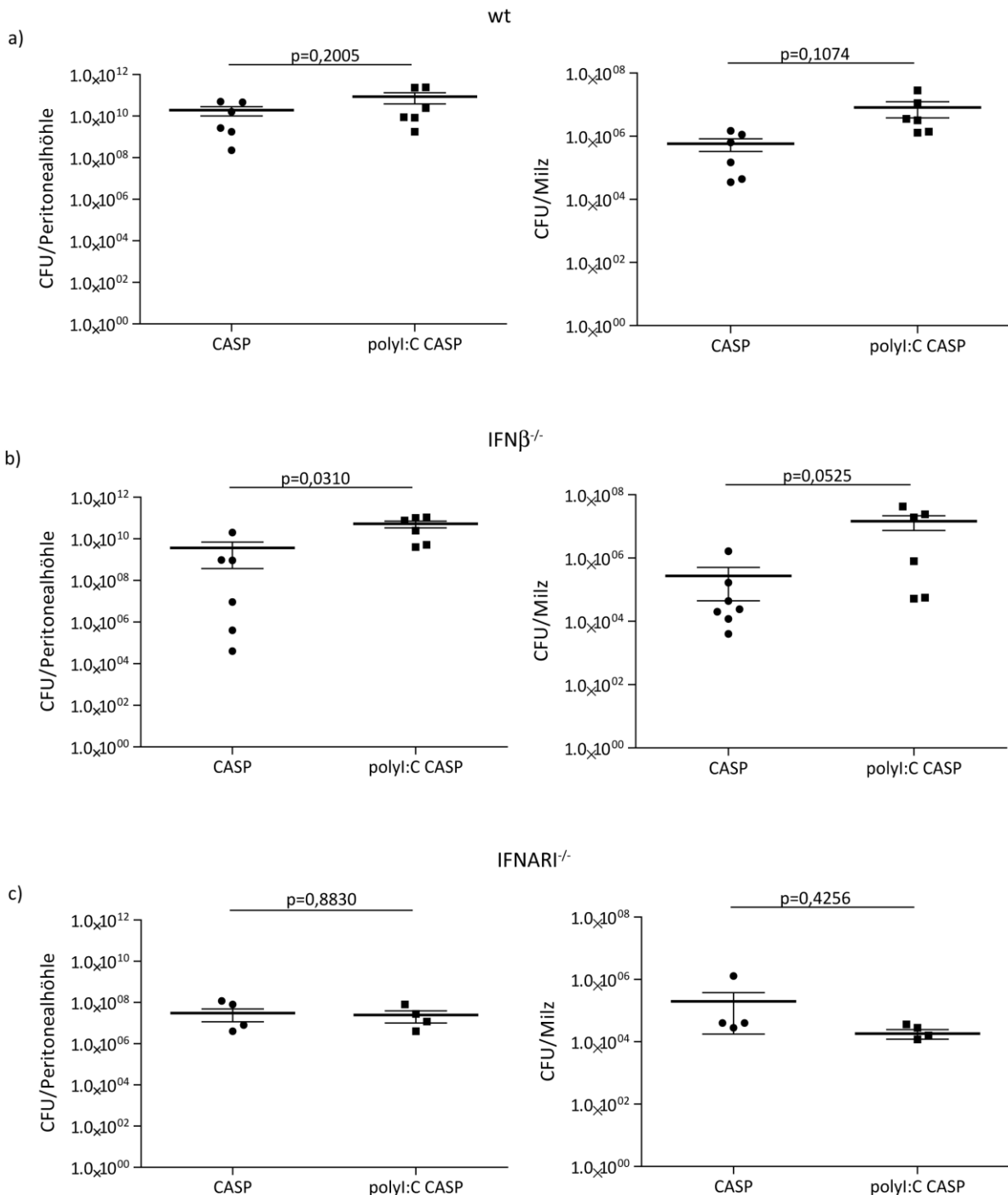


Abbildung 2.16 Einfluss von IFN β und des IFNAR auf die bakterielle Last der Peritonealhöhle und der Milz nach CASP-OP im Kontext einer viralen Infektion.

a) C57Bl/6 wt, b) IFN β ^{-/-} b) und c) IFNARI^{-/-} wurden naiv belassen oder für 24 h mit 200 μ g polyI:C stimuliert. Die CASP-OP wurde mit einem 14G Stent durchgeführt. Zur Bestimmung der bakteriellen Last wurden nach 12 h serielle Verdünnungen von Peritoneallavage und Milzhomogenaten auf Blutagarplatten ausgestrichen. Für alle Genotypen gilt n=6-7. IFNARI^{-/-} Mäuse wiesen z.T. kein Bakterienwachstum auf (CFU=0), daher in der logarithmischen Darstellung nicht abgebildet, bilden jedoch einen Teil der Statistik.

Somit induziert eine Virusinfektion eine Typ I IFN vermittelte Immunantwort, die zu einer Erhöhung der lokalen und systemischen colony forming units (CFU) führt, da es in Abwesenheit des IFNARI und somit einer Abwesenheit von Typ I IFN vermittelten Immunantworten zu keiner Veränderung der CFU kam.

2.2.1.3 Einfluss einer viral induzierten Typ I IFN Antwort auf die zelluläre Zusammensetzung in der Peritonealhöhle

Ein weiterer wichtiger Parameter, der das Überleben während einer polymikrobiellen Peritonitis wesentlich beeinflusst, ist die Anwesenheit und die Aktivität von Effektorzellen des Immunsystems. Im naiven Zustand sind vor allem M Φ und einige T und B Zellen in der Peritonealhöhle zu finden. Nach CASP-OP sind die ersten Zellen, die in der frühen Phase einwandern, vor allem Granulozyten. Sie stellen die wichtigsten Effektorzellen der frühen Immunantwort in der CASP dar, gefolgt von M Φ . Sie tragen zur Eliminierung der Bakterien und zur Aktivierung einer effektiven Immunantwort bei. Um die Relevanz von IFN β und des IFNARI für die frühe Rekrutierung von Effektorzellen in die Peritonealhöhle zu untersuchen, wurde das Zellinfiltrat 12 h nach CASP-OP durchflusszytometrisch analysiert.

Im naiven Zustand und nach alleiniger polyI:C Stimulation konnten kaum Granulozyten in der Peritonealhöhle nachgewiesen werden. Nach CASP-OP kam es zu einer hohen Infiltrationsrate der Granulozyten in die Peritonealhöhle in allen drei getesteten Genotypen. Die absoluten Zahlen lagen bei ca. $3-4 \times 10^6$ Granulozyten pro Maus. Im Gegensatz dazu kam es zu einer geringeren Zunahme der Infiltrationsrate der Granulozyten bei einer erfolgten polyI:C Vorstimulation. Sowohl wt als auch IFN $\beta^{-/-}$ Mäuse zeigten signifikant niedrigere Zellzahlen nach CASP-OP mit polyI:C Vorstimulation (wt $p=0,0214$; IFN $\beta^{-/-}$ $p=0,0102$). Wt Mäuse wiesen nur noch ca. 1×10^5 Zellen und IFN $\beta^{-/-}$ Mäuse ca. 5×10^5 Zellen in der Peritonealhöhle auf (s. Abb. 2.17a). Im Gegensatz dazu zeigten IFNARI $^{-/-}$ Mäuse eine geringere, nicht signifikante Abnahme der Granulozytenzahlen ($p=0,0961$). In IFNARI $^{-/-}$ Mäusen konnten weiterhin ca. 1×10^6 Granulozyten nachgewiesen werden (s. Abb. 2.17a). Parallel zur Infiltration der Granulozyten wurde eine Abnahme der M Φ in der Peritonealhöhle aller drei Genotypen beobachtet. So wurden die höchsten M Φ -Zahlen mit $3-8 \times 10^5$ Zellen im naiven Zustand und nach polyI:C Stimulation beobachtet. Hier lagen keine wesentlichen Unterschiede in den drei verschiedenen Genotypen vor. 12 h nach CASP-OP kam es bereits zu einer Abnahme der M Φ in der Peritonealhöhle mit nur noch ca. 2×10^5 Zellen. Die Abnahme der M Φ war nach CASP-OP mit einer polyI:C Vorstimulation bei wt Mäusen signifikant höher als nach CASP allein ($p=0,032$). So konnten nur noch ca. 5×10^4 Zellen nachgewiesen werden. IFN $\beta^{-/-}$ und IFNARI $^{-/-}$ Mäuse zeigten ebenfalls eine weitere, jedoch keine signifikante Abnahme der M Φ in der Peritonealhöhle (IFN $\beta^{-/-}$ $p=0,2415$; IFNARI $^{-/-}$ $p=0,2346$). Hier konnten noch ca. 1×10^5 Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 2.17b).

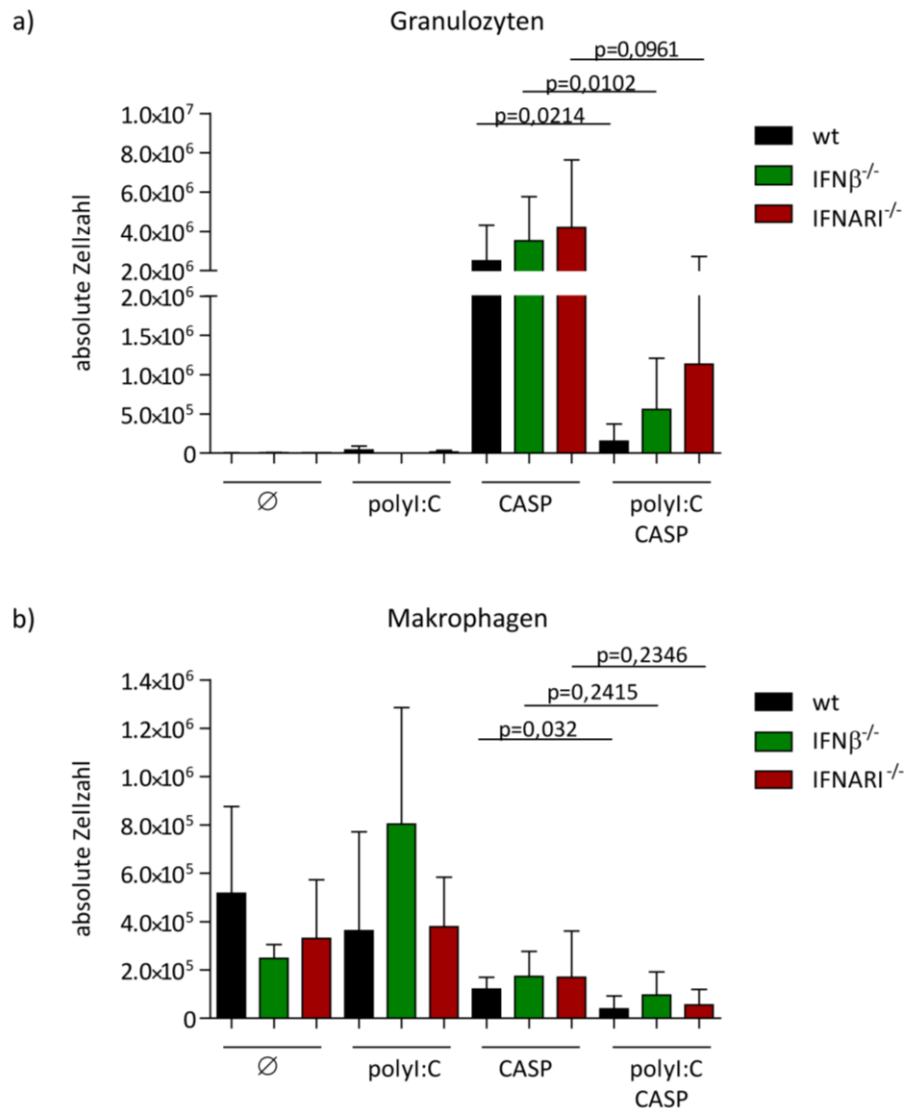


Abbildung 2.17 Einfluss von IFN β und des IFNAR auf die zelluläre Komposition der Peritonealhöhle nach CASP-OP im Kontext einer viralen Infektion.

C57Bl/6 wt, IFN β ^{-/-} und IFNARI^{-/-} wurden naiv belassen oder für 24 h mit 200 μ g polyI:C stimuliert. Die darauffolgende CASP-OP wurde mit einem 14G Stent in naiven und stimulierten Mäusen durchgeführt. Nach 12 h wurden die absoluten Zellzahlen von a) Granulozyten und b) M Φ mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Für alle Genotypen n=6-7). Die Granulozyten wurden auf Gr1⁺, CD11b⁺, CD11c⁻ Zellen gegatet. M Φ wurden auf GR1⁻, CD11b⁺, CD11c⁻ Zellen gegatet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IFN β und in einem stärkeren Maß das Typ I IFN System die Infiltration von Granulozyten und M Φ während der CASP beeinflussen. So wurde die Granulozyteninfiltration vor allem durch IFNARI inhibiert. IFN β war in der Granulozytenrekrutierung redundant, da hier ebenfalls eine signifikante Abnahme der Granulozyten festgestellt wurde. Für die Rekrutierung von Granulozyten nach alleiniger CASP hatten IFN β und IFNARI keinen Einfluss, da alle drei Genotypen vergleichbare Zellzahlen aufwiesen (s. Abb. 2.17a). Weiterhin konnte eine Abnahme der M Φ in der Peritonealhöhle in Abhängigkeit von IFN β und IFNARI detektiert werden. Hiermit konnte gezeigt werden, dass IFN β und in einem stärkeren Maße das Typ I IFN System Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung der Peritonealhöhle nehmen.

2.2.1.4 Einfluss einer viral induzierten Typ I IFN Antwort auf die Zytokinsekretion während der CASP

Außer der Höhe der Bakterienlast und der Anwesenheit von Effektorzellen trägt das Zytokinmilieu eine entscheidende Rolle zum Überleben der CASP bei. So kann es bei einer überschießenden proinflammatorischen Immunantwort zu einem septischen Schock kommen. Im Gegensatz dazu kann es bei einer zu schwachen Immunantwort zu einer schnelleren Streuung von Bakterien und einer Sepsis kommen. Daher ist ein wohl abgestimmtes Gleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen für den Verlauf der CASP von großer Bedeutung. Die Relevanz der hier getesteten Zytokine wurde bereits in vorangehenden Publikationen untersucht. So konnte gezeigt werden, dass IL-12p40 einen protektiven Effekt auf die CASP ausübt. IL-12p40^{-/-} Mäuse zeigten gegenüber wt Mäusen ein kürzeres Überleben (Entleutner et al., 2006). TNF α , ein proinflammatorischer Faktor, wird als das Zytokin gehandelt, welches den septischen Schock vermittelt. IL-10 stellt ein antiinflammatorisches Zytokin dar und wirkt in der CASP ebenfalls protektiv (Emmanuilidis et al., 2001). Das polyI:C induzierte IFN β und das Typ I IFN System führen nicht nur zur Induktion des antiviralen Status, sondern agieren auch als wichtige Immunmodulatoren. Ihr immunmodulatorischer Einfluss konnte z.B. für IL-12p40 und TNF α nachgewiesen werden (Dalod et al., 2002; Huys et al., 2009). Im Folgenden sollte der immunmodulatorische Einfluss von IFN β und IFNARI auf die Zytokinsekretion der genannten Zytokine untersucht werden. Hierzu wurden die Zytokinkonzentrationen im Serum und der Peritonealhöhle 12 h nach CASP-OP bestimmt.

Im naiven Zustand konnte im Serum kaum IL-12p40 detektiert werden. 12 h nach CASP-OP konnte in wt Mäusen die höchste IL-12p40 Konzentration mit ca. 5000 pg/ml gemessen werden, während IFN β ^{-/-} und IFNARI^{-/-} Mäuse eine Konzentration von ca. 1500 pg/ml aufwiesen. Alle drei Genotypen zeigten nach CASP-OP mit polyI:C Vorstimulation einen signifikanten Anstieg der IL-12p40 Konzentration, wobei IFNARI^{-/-} die niedrigste Konzentration mit ca. 4000 pg/ml, gegenüber 12000pg/ml in IFN β ^{-/-} und 19000 pg ml in wt Mäusen zeigten (wt p=0,0012; IFN β ^{-/-} p=0,0147, IFNARI^{-/-} p=0,0100; (s. Abb. 2.18a)).

Zusätzlich zu IL-12p40 wurde die IFN β Konzentration im Serum bestimmt. Seren von IFN β ^{-/-} Mäusen dienten dabei als Spezifitätskontrolle. Hier konnte in keinem der getesteten Seren ein unspezifisches Signal gemessen werden. Weiterhin wurde in wt Mäusen nur eine sehr niedrige IFN β Konzentration (ca. 0,2 pg/ml) gemessen, während in Seren von IFNARI^{-/-} Mäusen kein Signal detektiert wurde. Nach CASP konnte eine ähnliche Konzentration in wt und IFNARI^{-/-} Mäusen mit ca. 5-10 pg/ml nachgewiesen werden. Nach CASP-OP mit vorangehender polyI:C Stimulation konnte ein leichter, jedoch kein signifikanter Anstieg der IFN β Konzentration in Seren von wt Mäusen nachgewiesen werden (p=0,0625), während die Konzentration in IFNARI^{-/-} Mäusen unverändert blieb (p=0,9200; (s. Abb. 2.18a)).

Aufgrund des geringen Serumvolumens wurden die weiteren Zytokine in der Peritoneallavage bestimmt. Auch hier wurde die IL-12p40 Konzentration bestimmt. Das Profil der IL-12p40 Konzentration war dem des Serums ähnlich. So wiesen alle Genotypen eine kaum detektierbare Menge im naiven Zustand und nach polyI:C Stimulation auf. Weiterhin konnten nur ca. 500 pg/ml bei wt und ca. 200 pg/ml bei IFN β ^{-/-} und IFNARI^{-/-} Mäusen detektiert werden. So wies auch hier der wt die höchste Konzentration an IL-12p40 auf. Nach CASP-OP mit polyI:C Stimulation konnte ein

signifikanter Anstieg der IL-12p40 Konzentration in wt (5000 pg/ml; $p=0,0055$) und $IFN\beta^{-/-}$ Mäusen (4000 pg/ml; $p=0,0010$) ermittelt werden. $IFNARI^{-/-}$ Mäuse zeigten nur einen leichten, nicht signifikanten Anstieg der IL-12p40 Konzentration (ca. 500 pg/ml; $p=0,0643$; (s. Abb. 2.18 b)).

Für $TNF\alpha$ konnte ein vergleichbares Produktionsprofil zu IL-12p40 detektiert werden. Im naiven Zustand konnte keine, bis eine sehr geringe Konzentration gemessen werden. Nach CASP allein zeigten wt Mäuse auch hier die höchste Zytokinkonzentration (ca. 250 pg/ml), während $IFN\beta^{-/-}$ und $IFNARI^{-/-}$ Mäuse eine geringere Zytokinproduktion aufwiesen (ca. 100 pg/ml). Nach CASP mit polyI:C Vorstimulation kam es zu einem signifikanten Anstieg der $TNF\alpha$ Konzentration in wt und $IFN\beta^{-/-}$ Mäusen mit ca. 800 - 1000 pg/ml, jedoch nicht in $IFNARI^{-/-}$ Mäusen mit ca. 100 pg/ml (wt $p=0,0004$; $IFN\beta^{-/-}$ $p=0,0410$; $IFNARI^{-/-}$ $p=0,0643$).

Zuletzt wurde die Konzentration von IL-10 bestimmt. Dieses konnte ebenfalls im naiven Zustand und nach polyI:C kaum detektiert werden. 12 h nach CASP-OP wurde die geringste Menge in wt Mäusen mit ca. 1000 pg/ml ermittelt. $IFN\beta^{-/-}$ und $IFNARI^{-/-}$ Mäuse zeigten eine ca. dreifach höhere IL-10 Konzentration mit ca. 2800 – 3200 pg/ml. In keinem der drei Genotypen kam es zu einem signifikanten Unterschied der Zytokinkonzentration nach CASP-OP mit polyI:C Stimulation (s. Abb. 2.18b).

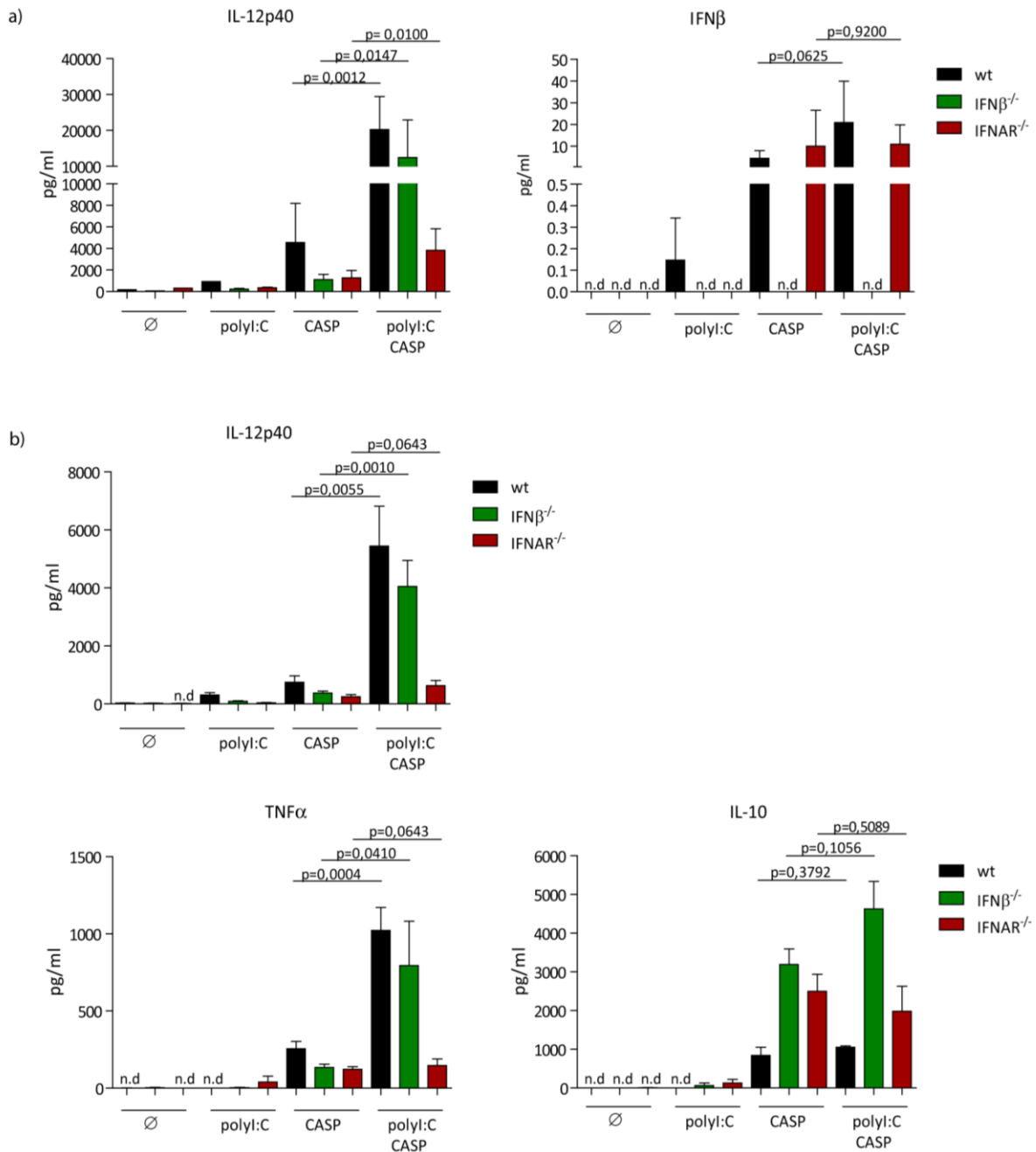


Abbildung 2.18 Abhängigkeit der *in vivo* Zytokinsekretion von IFNβ und des IFNAR nach CASP-OP im Verlauf einer viralen Infektion.

C57Bl/6 wt, IFNβ^{-/-} und IFNAR^{-/-} wurden naiv belassen oder für 24 h mit 200 µg polyIC stimuliert. Die CASP-OP wurde mit einem 14G Stent durchgeführt. Zur Bestimmung der Zytokinproduktion wurden a) das Serum und b) die Peritoneallavage 12 h nach CASP-OP per ELISA analysiert.

Somit konnte durch Bestimmung der Konzentrationen wichtiger Zytokine ein Einfluss von IFNβ und vor allem des Typ I IFN Systems nachgewiesen werden. Es kam zu einer geringeren Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-12p40 und TNFα bei einer IFNAR1 Defizienz. Für IL-12p40 konnte dies systemisch im Serum und lokal in der Peritoneallavage gezeigt werden. Bei einer vorliegenden IFNβ Defizienz konnte dieser abschwächende Effekt nur in einem sehr geringen Maße im Vergleich zum wt gezeigt werden, so dass IFNβ hier eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

2.2.2 *In vivo* Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression

Im vorangehenden Abschnitt konnte die immunmodulatorische Rolle von IFN β und des IFNARI in der polymikrobiellen Peritonitis dargestellt werden. IFN β und vor allem Typ I IFN übten einen detrimentalen Effekt auf den Verlauf der polymikrobiellen Peritonitis aus. Ihre Anwesenheit führte zu einer kürzeren Überlebenszeit, zu einer lokal verminderten Präsenz von Effektorzellen und zu einer Modulation der Produktion essentieller Zytokine, wie IL-12p40 und TNF α .

Im folgenden Abschnitt sollte die Koexpression zweier in der CASP konträr agierender Zytokine untersucht werden. Während IL-12p40 einen protektiven Effekt vermittelt und essentiell für das Überleben ist, übt IFN β als Mitglied der Typ I IFN, eine detrimentalen Rolle während der CASP aus und führt zu einer geringeren Überlebenszeit. Die Expression beider Zytokine wurde unter Verwendung des bicistronischen Reportermausmodells IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} auf Einzelzellebene durchflusszytometrisch analysiert. Für die Analyse der das Reporterallel exprimierenden Zellen wurde eine einheitliche Gating-Strategie verwendet (s. Abb. 2.19). Unter Ausschluss der toten DAPI⁺ Zellen, CD3 ϵ ⁺ T Zellen und CD19⁺ B Zellen erfolgte die genaue Analyse von CD11c⁺ Zellen, da diese bereits als Hauptproduzenten von IL-12p40/GFP und IFN β /YFP beschrieben wurden (Reinhardt et al., 2006; Scheu et al., 2008). Zusätzlich wurden die absoluten Zellzahlen der Reporterallel exprimierenden Zellen bestimmt.

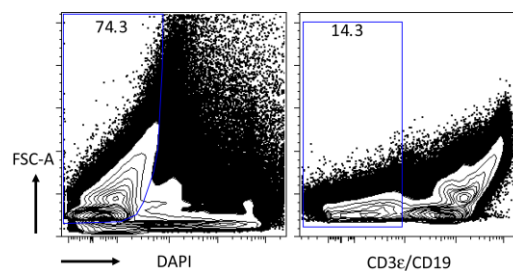


Abbildung 2.19 Gating Strategie für *in vivo* Analysen der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression.

2.2.2.1 *In vivo* Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in naiven Doppelreporter-Mäusen

Zunächst wurde die IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression im naiven Zustand untersucht, um die basale Expression beider Zytokine zu analysieren. Für IL-12p40 ist bereits bekannt, dass es auch unter naiven Bedingungen exprimiert wird, weshalb die Frequenz der IL-12p40/GFP⁺ Zellen untersucht werden sollte (Reinhardt et al., 2006). Im Gegensatz dazu wird IFN β /YFP nur nach Stimulation exprimiert (Scheu et al., 2008).

Die Analyse der IL-12p40/GFP Expression auf Einzelzellebene konnte CD11c⁺ Zellen als die Hauptproduzenten identifizieren. Die phänotypische Charakterisierung der CD11c⁺, IL-12p40/GFP⁺ Zellen konnte zeigen, dass diese vor allem CD11b⁻, CD8 α ⁺, B220⁻ waren (1,61 %). Ca. ein Viertel waren CD11b⁺, CD8 α ⁻, B220⁻ Zellen (0,65 %). Somit konnten die IL-12p40/GFP Produzenten zwei Subpopulationen von cDCs zugewiesen werden. Insgesamt konnten ca. 2,2 % der CD11c⁺ Zellen als IL-

IL-12p40/GFP⁺ detektiert werden (s. Abb. 2.20).

Die Analyse der IFNβ/YFP Expression konnte keine Koexpression im naiven Zustand nachweisen (s. Abb. 2.20).

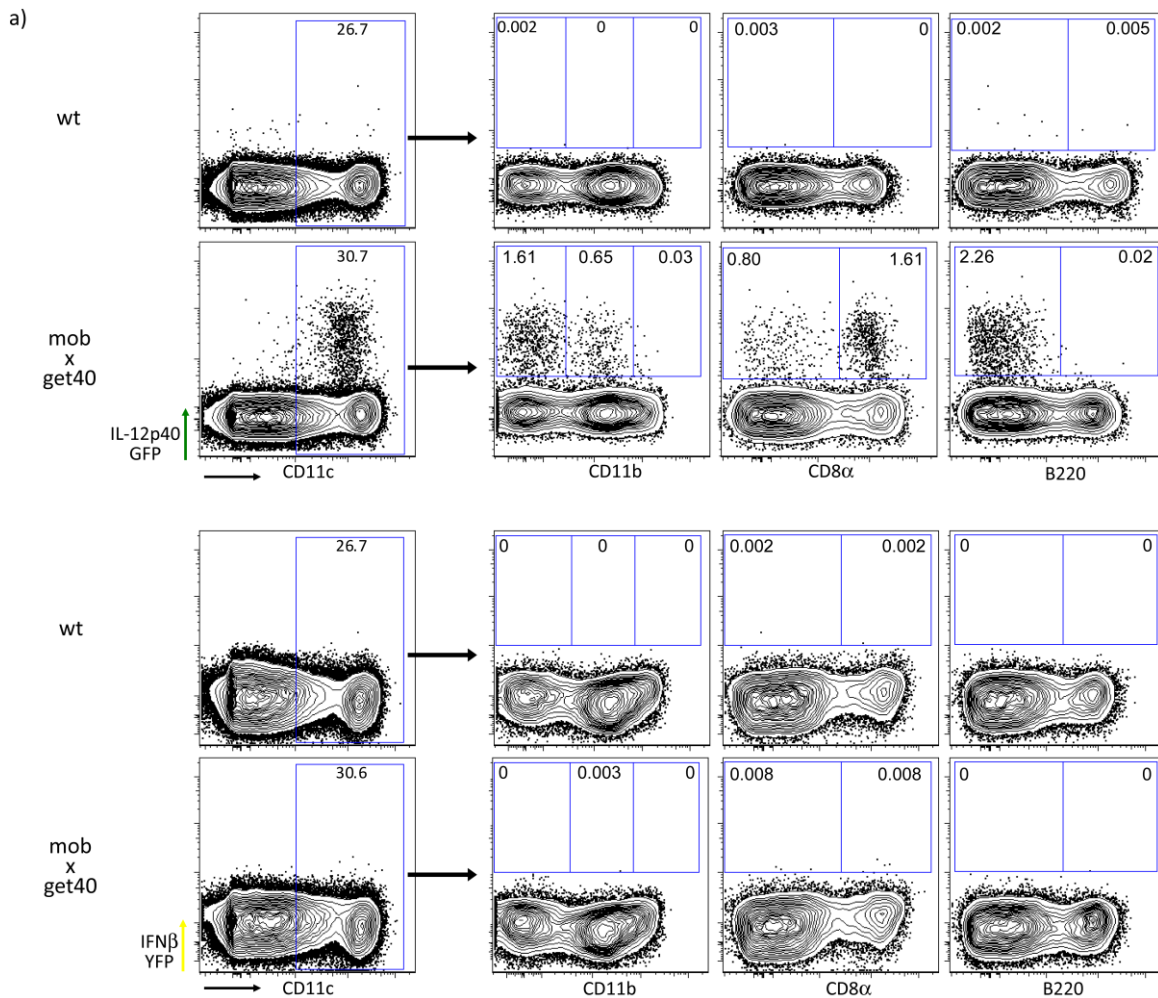


Abbildung 2.20 *In vivo* Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP Expression in der Milz von naiven IL-12p40^{get40/get40} x IFNβ^{mob/mob} Doppel-Reporterermäusen.

Dargestellt ist die phänotypische Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP produzierenden Zellen im naiven Zustand. Das Analysegate der Reporterallel-exprimierenden Zellen wurde der jeweils entsprechenden IL-12p40^{wt/wt} x IFNβ^{wt/wt} Kontrolle angepasst. Die abgebildeten Zellen stellen lebende, nicht T und B Zellen dar.

Die Analyse der IL-12p40/GFP⁺ Zellen im naiven Zustand und die Identifizierung CD8α⁺ cDCs als Hauptproduzenten konnte somit bisher publizierte Daten bestätigen. Weiterhin konnte eine kleinere CD8α⁺ cDC Population als IL-12p40/GFP Produzenten identifiziert werden. Die Analyse der IFNβ/YFP Expression geht ebenfalls mit der aktuellen Datenlage einher, dass es nur nach Stimulation zu einer IFNβ Expression kommt.

2.2.2.2 *In vivo* Charakterisierung der IFN β /YFP und IL-12p40/GFP Produzenten während der CASP und nach polyI:C Vorstimulation in der Milz und Peritonealhöhle

Die Bestimmung der IL-12p40 Produktion konnte zeigen, dass es während der CASP lokal in der Peritonealhöhle produziert wurde und systemisch im Serum nachzuweisen war (s. Abschnitt 2.2.1.3; s. Abb. 2.18). Die Bestimmung der IFN β Konzentration konnte eine niedrige, jedoch systemische Präsenz im Serum nachweisen. Aufgrund der niedrig detektierten Konzentrationen im Serum wurde die IFN β Produktion in der Peritonealhöhle nicht weiter untersucht, da die hohe Verdünnung der Peritoneallavage eine Detektion verhindert. Somit sollte die Untersuchung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression Erkenntnisse über die Identität der Reporterallel exprimierenden Zellen in der CASP liefern.

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen der Peritonealhöhle nach CASP konnte zeigen, dass IL-12p40/GFP Produzenten CD11c⁺, CD11b^{+/-}, CD8 α ⁻, B220⁻ waren. Der Anteil der IL-12p40/GFP Produzenten war jedoch sehr gering (ca. 0,04 %). Die vorherige polyI:C Stimulation führte zu keiner wesentlichen Veränderung in der IL-12p40/GFP Expression. Auch hier waren die Reporterallel exprimierenden Zellen CD11c⁺, CD11b^{+/-}, CD8 α ⁻, B220⁻. Es konnte jedoch ein leichter Anstieg in der Frequenz detektiert werden (0,01 % der CD11c⁺ Zellen (s. Abb. 2.21)).

Die Expression von IFN β /YFP während der CASP mit oder ohne vorangegangene polyI:C Stimulation konnte nicht zuverlässig detektiert werden. Die Detektion einzelner IFN β /YFP⁺ Zellen könnte auch auf Autofluoreszenz zurückzuführen sein (s. Abb. 2.21).

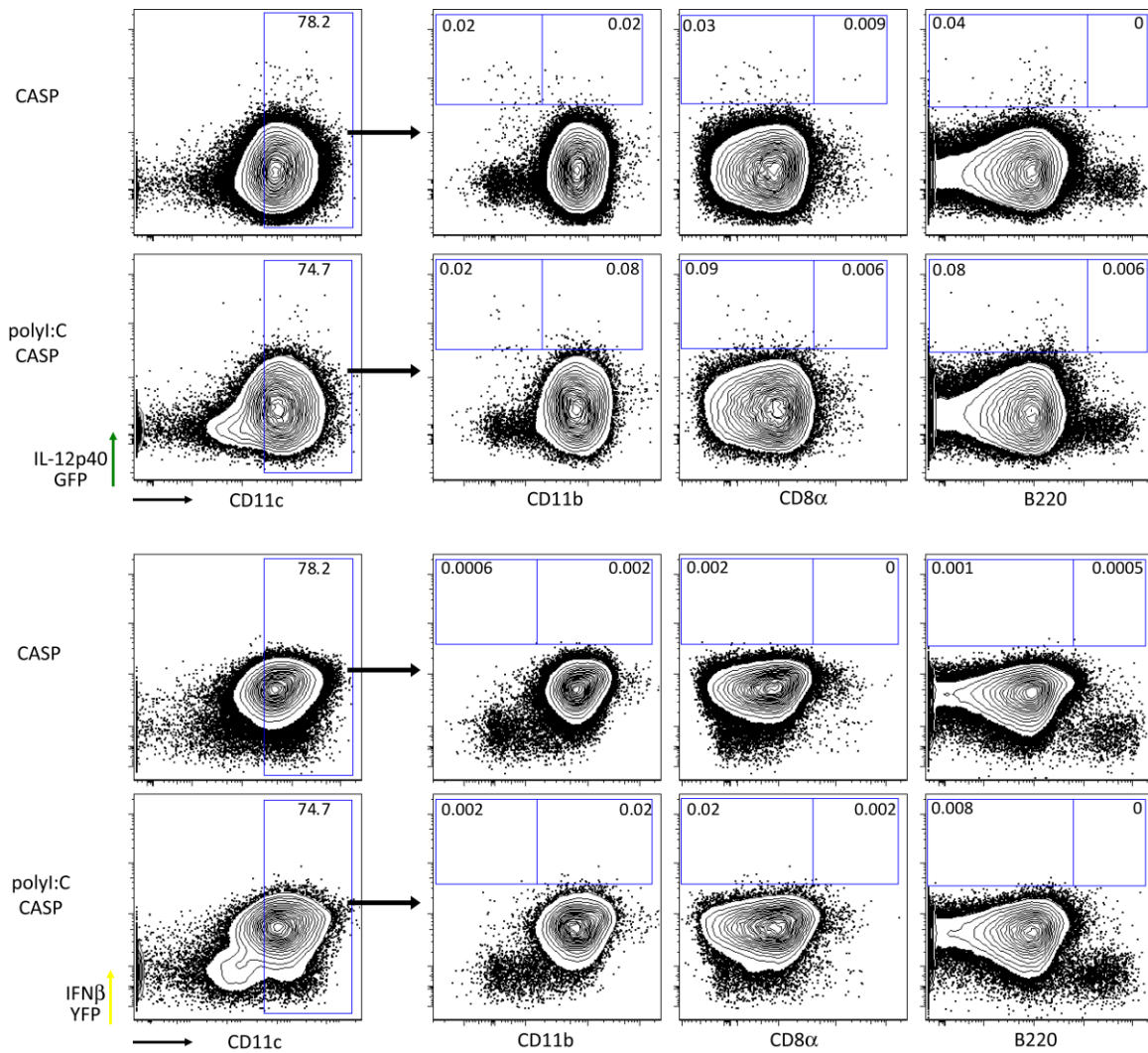


Abbildung 2.21 Analyse der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten in der Peritonealhöhle nach CASP-OP. IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} Mäuse wurden unstimuliert belassen oder für 24 h mit 200 μ g polyI:C stimuliert. 24 h nach erfolgter CASP-OP (14G) wurde die IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in Zellen der Peritonealhöhle mittels FACS untersucht. Die Analyseegates wurden gleichbehandelten IL-12p40^{wt/wt} x IFN β ^{wt/wt} Mäusen angepasst (Daten nicht gezeigt).

Innerhalb der Milz konnte dagegen eine Koexpression von IL-12p40/GFP und IFN β /YFP nach CASP und nach polyI:C Stimulation mit anschließender CASP gezeigt werden. IL-12p40/GFP exprimierende Zellen waren erneut CD11c⁺ cDCs. Diese waren nach CASP vor allem CD11b⁺ mit 2,76 % gegenüber 1,62 % der CD11b⁻ Zellen. Weiterhin waren die IL-12p40 produzierenden Zellen in 3,59 % CD8 α ⁻ und nur 0,93 % der GFP Produzenten waren CD8 α ⁺. Nahezu 90 % der IL-12p40/GFP⁺ Zellen waren jedoch B220⁻ (3,56 % B220⁻ gegenüber 0,41 % B220⁺). Nach CASP mit polyI:C Stimulation kam es in gleichen DC Subpopulationen zu einer IL-12p40/GFP Expression, wobei es nur in ca. 3,2 % der CD11c⁺ Zellen zu einer IL-12p40/GFP Expression kam. Zusätzlich kam es zu einer Verschiebung in den Frequenzen der beteiligten DC Subpopulation. Nach polyI:C Stimulation waren ca. 40 % der IL-12p40/GFP⁺ Zellen CD8 α ⁺ (1,30 %) gegenüber 20 % nach CASP allein (0,93 %; (s. Abb. 2.22a)).

Die gleichzeitige Detektion der IFN β /YFP Expression identifizierte während der CASP ohne und mit polyI:C Stimulation CD11c⁺, CD11b⁻, CD8 α ⁺, B220⁻ Zellen als Hauptproduzenten, wobei die detektierten Frequenzen sich mit 0,15 - 0,2 % der CD11c⁺ Zellen nicht deutlich unterschieden (s. Abb. 2.22a). Somit wurden die gleichen cDC Subpopulationen als IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten

identifiziert.

Weiterhin wurde die simultane IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in einigen wenigen Zellen beobachtet (s. Abb. 2.22b). Die Frequenzen lagen hier bei 0,03 % und 0,06 % der CD11c⁺ Zellen. Nur in einem geringen Anteil der Zellen kam zu einer Expression beider Reporterallele in ein und derselben Zelle. Die phänotypische Charakterisierung dieser GFP⁺/YFP⁺ Zellen ermittelte CD11c⁺, CD11b⁻, CD8 α ⁺, B220⁻ cDCs als Zellen, die zu einer simultanen Expression von IL-12p40/GFP und IFN β /YFP in der Lage waren.

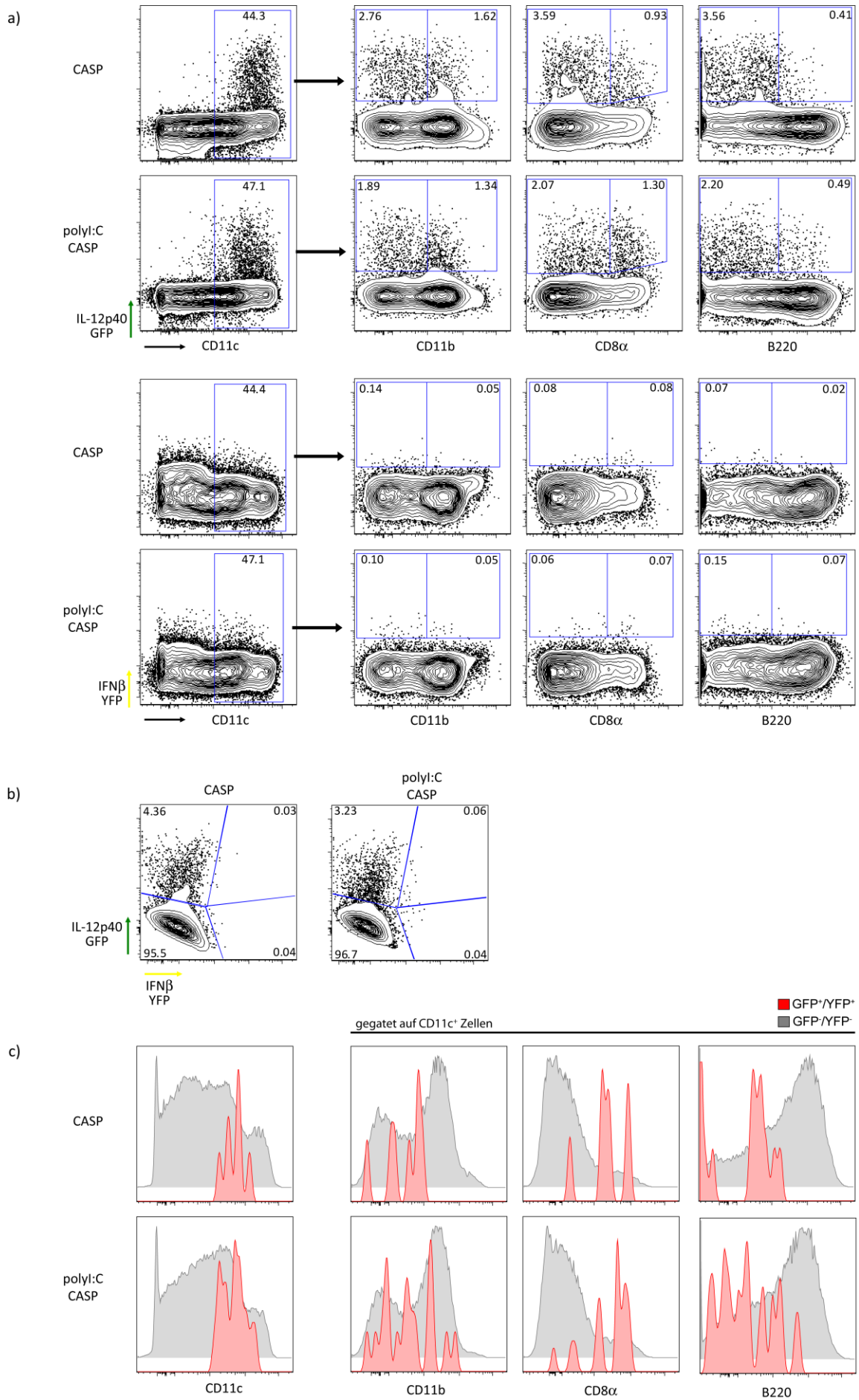


Abbildung 2.22 Analyse der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten in der Milz nach CASP-OP.

IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} Mäuse wurden unstimuliert belassen oder für 24 h mit 200 μ g polyI:C stimuliert. 24 h nach erfolgter CASP-OP (14G) wurde die IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in der Milz mittels FACS untersucht. Die Analyseegates wurden gleichbehandelten IL-12p40^{wt/wt} x IFN β ^{wt/wt} Mäusen angepasst (Daten nicht gezeigt). Dargestellt sind lebende, CD3 ϵ ⁻ und CD19⁻ Zellen. a) Phänotypische Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten. b) Darstellung der IL-12p40/GFP⁺ und IFN β /YFP⁺ Zellen. c) Zur phänotypischen Charakterisierung der GFP⁺/YFP⁺ Zellen wurden diese für CD11c den CD3 ϵ ⁻/CD19⁻ Zellen überlagert. Für die Charakterisierung der weiteren Marker wurden die GFP⁺/YFP⁺ Zellen den CD11c⁺ GFP⁻/YFP⁻ Zellen überlagert.

Die Untersuchung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression während der CASP konnte cDCs als Hauptproduzenten der beiden Reporterallele identifizieren. Die IL-12p40/GFP konnte im Gegensatz zur IFN β /YFP Expression in mehreren cDC Subpopulationen nachgewiesen werden. Eine IFN β /YFP Expression konnte exklusiv nur in einer der cDC Subpopulation detektiert werden. Die polyI:C Stimulation zur Simulation einer Virusinfektion und damit Induktion einer IFN β Expression führte nur im Fall der IL-12p40/GFP Expression zu leichten Verschiebungen in den produzierenden cDC Subpopulationen, während die Frequenzen und die produzierenden cDC Subpopulationen unverändert blieben.

Die Bestimmung der absoluten Zellzahlen der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten während der CASP basierte auf den hier dargestellten Ergebnissen (s. Abb. 2.21 und 2.22). In der Milz wurden ca. $4,2 \times 10^4$ nach CASP und ca. $4,5 \times 10^4$ Zellen nach polyI:C und CASP bestimmt. Hier trugen die GFP⁺/YFP⁺ Zellen nur einen sehr geringen Anteil zur Gesamtzahl der IL-12p40/GFP⁺ Zellen bei. Somit kam es zu keiner signifikanten Änderung der Frequenz IL-12p40/GFP⁺ Zellen durch die polyI:C Stimulation (s. Abb. 2.23a). Für IFN β /YFP Produzenten konnte eine Gesamtzahl von 6×10^2 12 h nach CASP-OP ermittelt werden, wobei die GFP⁺/YFP⁺ Zellen ca. 50 % der IFN β /YFP⁺ Zellen ausmachten. Durch die polyI:C Stimulation kam es zu einer Verdopplung der IFN β /YFP⁺ Zellen, wobei dies vor allem auf die Zunahme GFP⁺/YFP⁺ zurückzuführen war (s. Abb. 2.23a).

Die Quantifizierung der IL-12p40/GFP Produzenten der Peritonealhöhle hat für CASP operierte Tiere ca. $1,5 \times 10^3$ Zellen und nach zusätzlicher polyI:C Stimulation ca. $2,5 \times 10^3$ Zellen in der Peritonealhöhle ergeben. Der Anstieg in der Frequenz der IL-12p40/GFP produzierenden Zellen nach polyI:C Vorstimulation korrelierte mit der erhöhten IL-12p40 Produktion in der Peritonealhöhle (s. Abb. 2.18b).

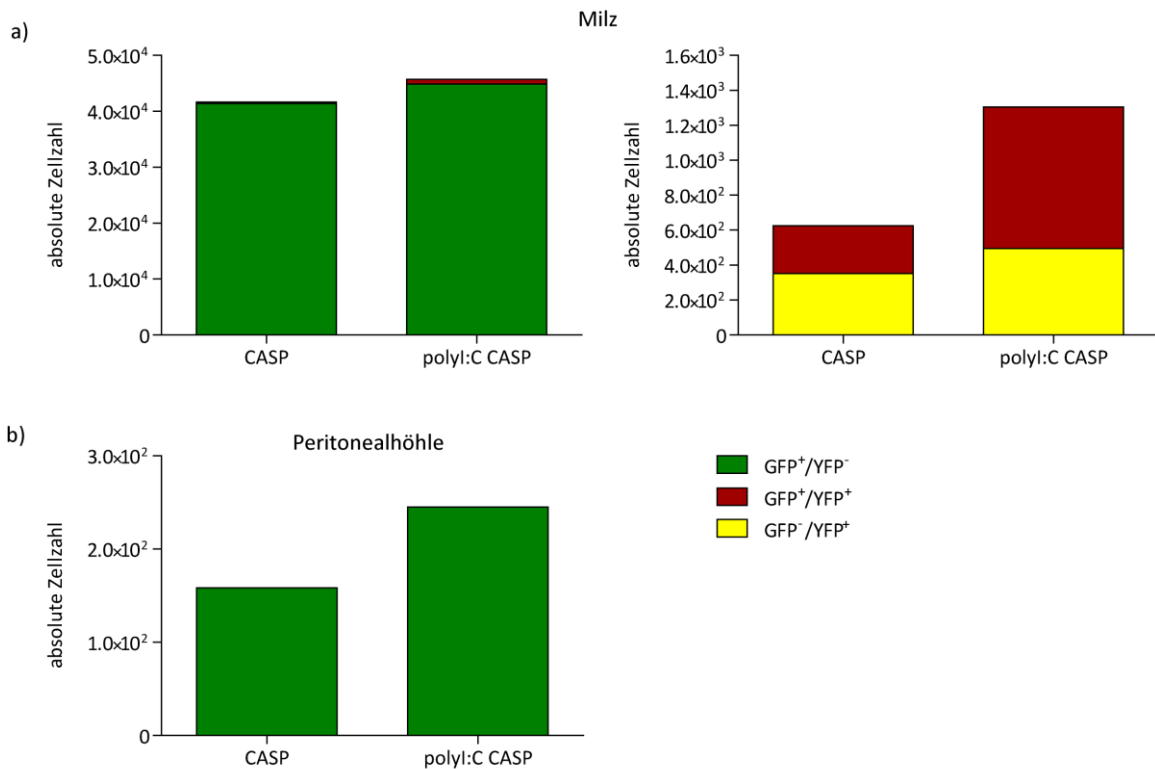


Abbildung 2.23 Quantifizierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten nach CASP-OP. Dargestellt ist die Analyse der absoluten Zellzahlen der Reporterallel-exprimierenden Zellen in der Milz (s. Abb. 2.22) und der Peritonealhöhle (s. Abb. 2.21).

Diese Ergebnisse lassen somit den Schluss zu, dass polyI:C vor allem die Frequenz IFN β /YFP⁺ Zellen erhöht, jedoch kaum Auswirkungen auf die Frequenz IL-12p40/GFP⁺ Zellen hat. Es führt jedoch zu einem signifikanten Anstieg der IL-12p40 Produktion, so dass pro Zelle mehr Zytokin produziert wird.

2.2.2.3 *In vivo* Charakterisierung und Lokalisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten nach polyI:C Stimulation

Die phänotypische Analyse der Reporterallel-exprimierenden Zellen nach polyI:C Stimulation sollte die Zellen identifizieren, die IL-12p40 und IFN β zum Zeitpunkt der CASP-Operation produzieren und somit auf den Verlauf der CASP Einfluss nehmen. Weiterhin sollte die Lokalisierung dieser Zellen weitere Schlüsse über deren Funktionalität ermöglichen.

Wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben, waren auch nach der alleinigen polyI:C Stimulation cDCs die Hauptproduzenten von IL-12p40/GFP und IFN β /YFP. Im Gegensatz zur IL-12p40/GFP Produktion nach CASP, kam es nach polyI:C Stimulation vor allem in CD11b⁻, CD8 α ⁺, B220⁻ cDCs zu einer Reporterallel Expression. Insgesamt konnte eine IL-12p40/GFP Expression in ca. 4,5 % der CD11c⁺ Zellen nachgewiesen werden.

Eine IFN β /YFP Expression wurde in der gleichen cDC Subpopulation wie nach CASP ermittelt. Die IFN β /YFP⁺ Zellen waren CD11c⁺, CD11b⁻, CD8 α ⁺, B220⁻ und machten ca. 0,9 % der CD11c⁺ Zellen aus (s. Abb. 2.24a). Durch die Verwendung der IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} Doppel-Reporterermäuse wurde zusätzlich die simultane IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression untersucht (s. Abb. 2.24b).

Phänotypisch entsprachen die GFP⁺/YFP⁺ Zellen den IFN β /YFP⁺ Zellen und stellten mit 0,3 % nur einen sehr geringen Anteil der CD11c⁺ Zellen dar (s. Abb. 2.24c).

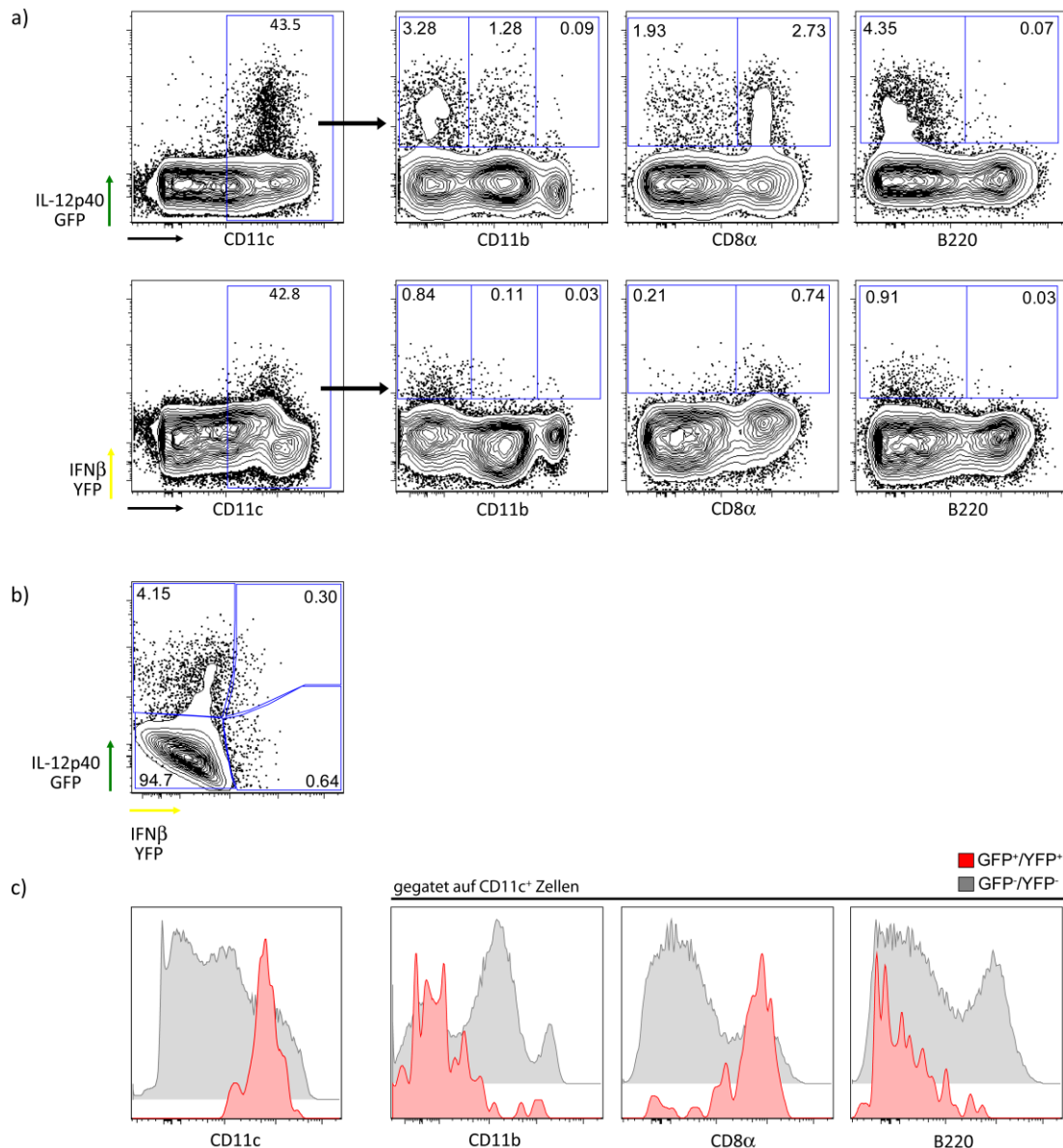


Abbildung 2.24 *In vivo* Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in der Milz nach polyI:C Stimulation.

IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} Doppel-Reporterma \ddot{u} se und IL-12p40^{wt/wt} x IFN β ^{wt/wt} M \ddot{a} use wurden f \ddot{u} r 24 h mit 200 μ g polyI:C, i.v. stimuliert. a) Dargestellt ist die ph \ddot{a} notypische Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP produzierenden Zellen in der Milz. Die Analysegates der Reporterallel-exprimierenden Zellen wurden den entsprechenden IL-12p40^{wt/wt} x IFN β ^{wt/wt} Kontrollen angepasst. Die dargestellten Zellen stellen lebende, nicht T- und B-Zellen dar. b) Darstellung der simultanen IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression. c) Zur ph \ddot{a} notypischen Charakterisierung der GFP⁺/YFP⁺ Zellen wurden diese f \ddot{u} r CD11c den CD3 ϵ ⁻/CD19⁻ Zellen \ddot{u} berlagert. F \ddot{u} r die Charakterisierung der weiteren Marker wurden die GFP⁺/YFP⁺ Zellen den CD11c⁺ GFP⁻/YFP⁻ Zellen \ddot{u} berlagert.

Somit waren nach polyI:C Stimulation vor allem CD11c⁺, CD11b⁻, CD8 α ⁺, B220⁻ cDCs f \ddot{u} r die Reporterallel Expression verantwortlich. Weiterhin wurden beide Reporterallele fast exklusiv exprimiert, da nur eine sehr geringe Frequenz von Zellen in der Lage war beide Reporterallele

simultan zu exprimieren.

Zusätzlich wurde die Lokalisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten in der Milz bestimmt. Hierzu wurde die Expression beider Reporterallele in IFN $\beta^{mob/mob}$, IL-12p40^{get40/get40} und IL-12p40^{wt/wt} x IFN $\beta^{wt/wt}$ und das IL-12p40 zur Kontrolle direkt detektiert.

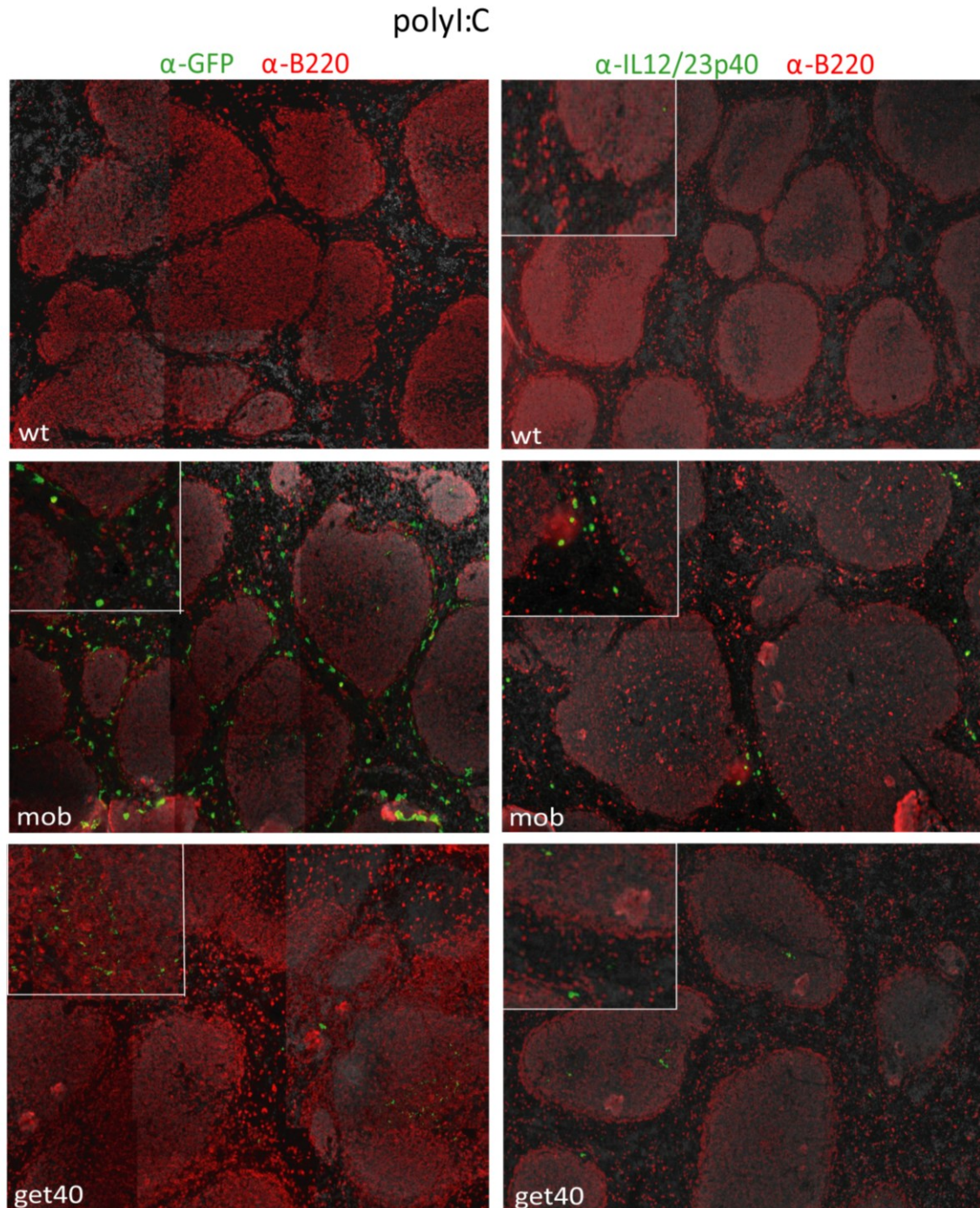


Abbildung 2.25 Lokalisierung der IL-12p40/GFP⁺, IL-12p40⁺ und IFN β /YFP⁺ Zellen in der Milz nach polyI:C Injektion.

IFN $\beta^{mob/mob}$, IL-12p40^{get40/get40} und IFN $\beta^{wt/wt}$ x IL-12p40^{wt/wt} Mäuse wurden für 24 h mit polyI:C i.v. stimuliert. Gewebeschnitte der Milzen wurden mit einem polyklonalen, kreuzreagierendem α -GFP Serum gegen YFP oder GFP gefärbt. B220⁺ Zellen wurden mit einem α -B220-bio AK gefärbt. Die Signale wurden mit Tyramid-FITC für YFP, GFP und IL-12p40 und mit Tyramid-bio und Streptavidin-Cy3 für B220 verstärkt. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Die immunhistologische Analyse zeigte unterschiedliche Aufenthaltsorte der IL-12p40/GFP⁺ und IFN β /YFP⁺ Zellen. In der IFN β ^{mob/mob} Maus konnten die YFP exprimierenden Zellen nach polyI:C Stimulation vor allem in der Marginalzone der weißen Pulpa lokalisiert werden, während die IL-12p40 exprimierenden Zellen vor allem in den T Zell Zonen der weißen Pulpa lokalisiert werden konnten. Dies konnte in allen drei Genotypen mittels direkter α -IL-12p40 Färbung gezeigt werden. Die α -GFP Färbung der IL-12p40^{get40/get40} Maus konnte diese Beobachtungen bestätigen.

Somit scheinen die IL-12p40/GFP und IFN β /YFP exprimierenden Zellen trotz der Produktion durch gleiche DC Supopulationen unterschiedliche Funktionen und Interaktionen mit anderen Zellen auszuüben.

2.2.2.4 *In vivo* Charakterisierung und Lokalisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten nach CpG Stimulation

Abschließend wurde die Identität und Lokalisierung der IFN β /YFP und IL-12p40/GFP produzierenden Zellen nach CpG2216 Stimulation analysiert. CpG ist ein PAMP bakteriellen Ursprungs und diente der Analyse der Reporterallel exprimierenden Zellen nach einer alternativen bakteriellen Stimulation. Im Gegensatz zu polyI:C ist es als ein sehr starker Induktor der IL-12p40 Expression bekannt.

Nach CpG Stimulation waren IL-12p40/GFP⁺ Zellen ebenfalls cDCs. Etwa 50 % der CD11c⁺ Zellen waren CD11b⁺, CD8 α ⁻, B220⁻ und die anderen 50 % waren CD11b⁻, CD8 α ⁺, B220⁻. Insgesamt wiesen ca. 7 % der CD11c⁺ Zellen eine IL-12p40/GFP Expression auf. IFN β /YFP⁺ Zellen zeigten eine Frequenz von ca. 0,3 % der CD11c⁺ Zellen auf und waren CD11b⁻, CD8 α ⁺ und B220⁺, was sie als pDCs identifizierte. Die Analyse der simultanen Expression der Reporterallele zeigte 0,14 % der CD11c⁺ Zellen als Produzenten beider Reporterallele. Somit waren 50 % der IFN β /YFP⁺ Zellen auch IL-12p40/GFP⁺ und ca. 1,5 % der IL-12p40/GFP⁺ Zellen. Phänotypisch waren IL-12p40/GFP⁺ cDCs, IFN β /YFP⁺ Zellen pDCs und IL-12p40/GFP⁺, IFN β /YFP⁺ Zellen ebenfalls pDCs.

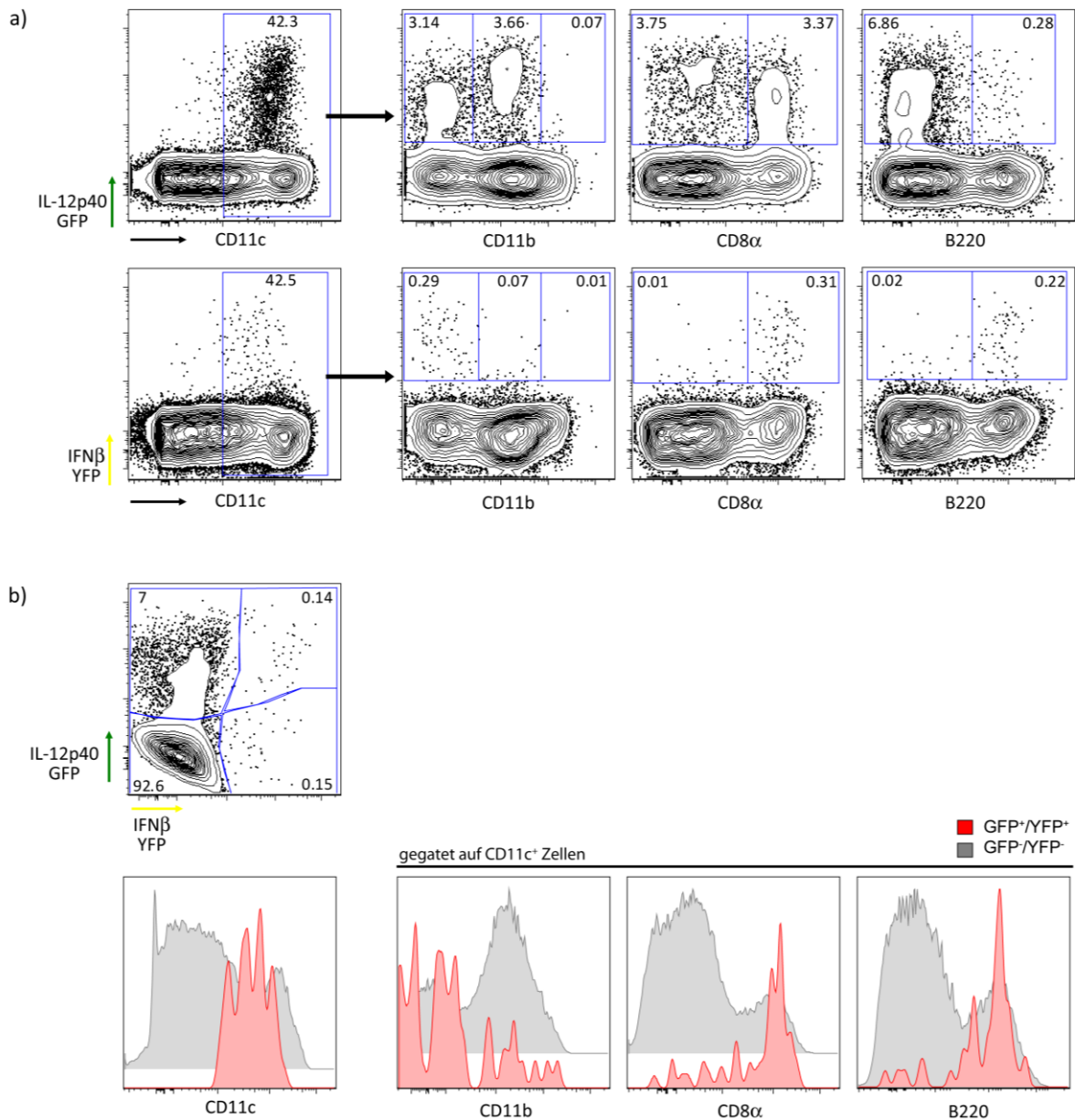


Abbildung 2.26 *In vivo* Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP Expression in der Milz nach CpG2216 Stimulation.

IL-12p40^{get40/get40} x IFNβ^{mob/mob} Doppel-Reportermaße und IL-12p40^{wt/wt} x IFNβ^{wt/wt} Mäuse wurden für 24 h mit 10 µg CpG2216 (DOTAP-komplexiert) stimuliert. a) Dargestellt ist die phänotypische Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP produzierenden Zellen in der Milz. Die Analyse gates der Reporterallel-exprimierenden Zellen wurden den entsprechenden IL-12p40^{wt/wt} x IFNβ^{wt/wt} Kontrollen angepasst. Die dargestellten Zellen stellen lebende, nicht T und B Zellen dar. b) Darstellung der simultanen IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP Expression. c) Zur phänotypischen Charakterisierung der GFP⁺/YFP⁺ Zellen wurden diese für CD11c den CD3ε⁻/CD19⁻ Zellen überlagert. Für die Charakterisierung der weiteren Marker wurden die GFP⁺/YFP⁺ Zellen den CD11c⁺, GFP⁻/YFP⁻ Zellen überlagert.

Die immunhistochemische Analyse wurde analog zur polyI:C Stimulation in IL-12p40^{wt/wt} x IFNβ^{wt/wt}, IFNβ^{mob/mob} und IL-12p40^{get40/get40} Mäusen durchgeführt.

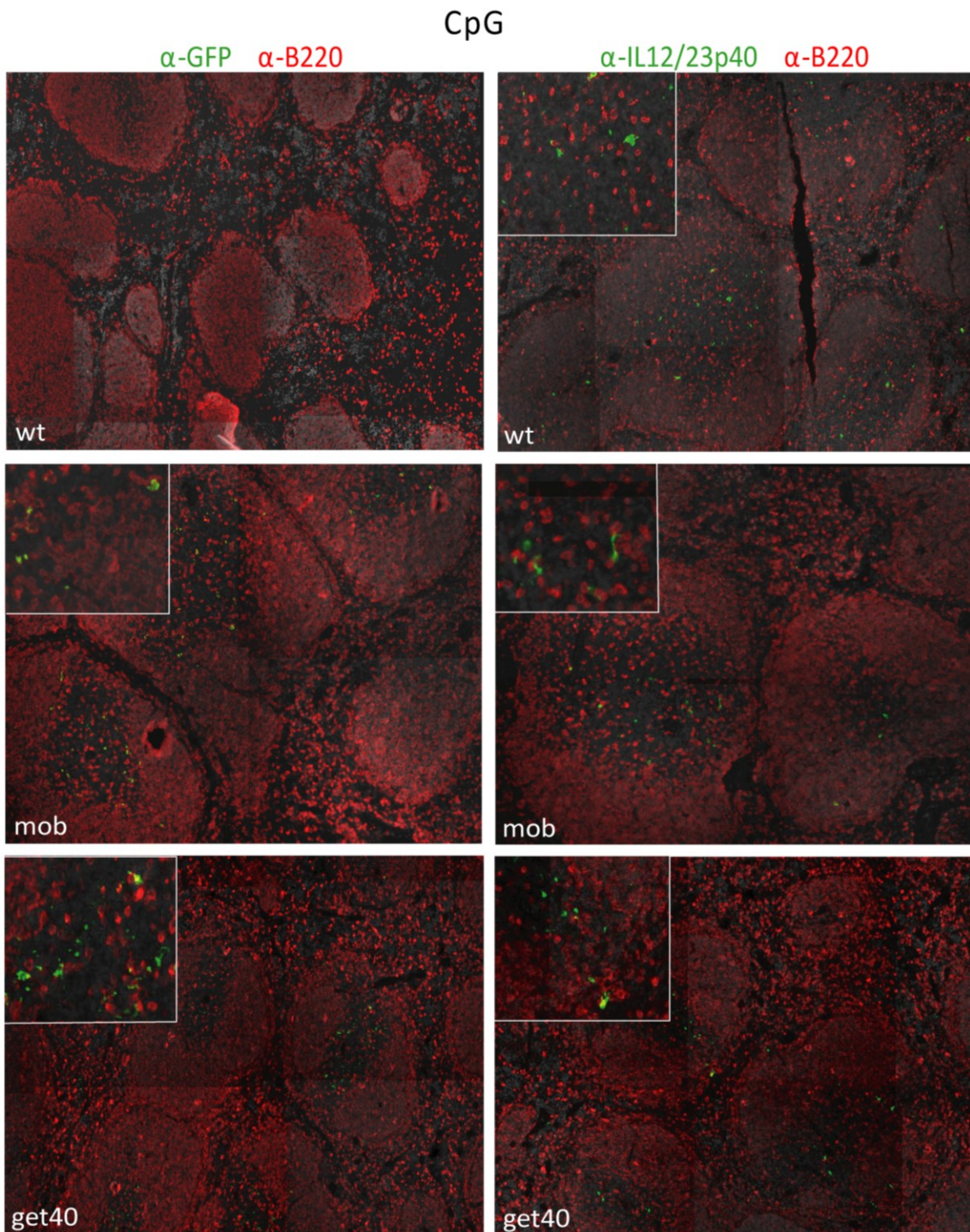


Abbildung 2.27 Lokalisierung der IL-12p40/GFP⁺, IL-12p40⁺ und IFN β /YFP⁺ Zellen in der Milz nach CpG2216 Injektion.

IFN β ^{mob/mob}, IL-12p40^{get40/get40} und IL-12p40^{wt/wt} x IFN β ^{wt/wt} Mäuse wurden für 24 h mit DOTAP-komplexiertem CpG stimuliert. Gewebeschnitte der Milzen wurden mit einem polyklonalem, kreuzreagierendem α -GFP Serum gegen YFP oder GFP gefärbt. B220⁺ Zellen wurden mit einem α -B220-bio AK gefärbt. Die Signale wurden mit Tyramid-FITC für YFP, GFP und IL-12p40 und mit Tyramid-bio und Streptavidin-Cy3 für B220 verstärkt. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Für alle drei Genotypen konnten die IL-12p40 Produzenten in der T Zellzone der weißen Pulpa durch die direkte Färbung des IL-12p40 Proteins lokalisiert werden (s. Abb. 2.27). Dies wurde durch die α -GFP-Färbung der IL-12p40^{get40/get40} Maus bestätigt. Die α -GFP Färbung der IFN β ^{mob/mob} Maus konnte zeigen, dass sich die IFN β /YFP Produzenten ebenfalls in der T Zellzone der weißen Pulpa aufhielten. Somit zeigten beide Zellpopulationen eine ähnliche Lokalisation nach CpG Stimulation.

Für die CpG2216 Stimulation konnte gezeigt werden, dass IL-12p40/GFP in zwei unterschiedlichen cDC Subpopulationen in etwa gleichen Frequenzen exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde IFN β /YFP exklusiv von pDCs exprimiert. Verglichen mit der polyI:C Stimulation weist dies auf eine spezifische Expression der beiden Zytokine bzw. Reporterallele in Abhängigkeit vom Stimulus hin. Auch die Lokalisation der Reporterallel exprimierenden Zellen wurde in Abhängigkeit vom Stimulus reguliert.

2.2.2.5 Quantifizierung der *in vivo* Expression von IL-12p40/GFP und IFN β /YFP der Milz

Zur statistischen Auswertung und Quantifizierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP produzierenden Zellen wurden die absoluten Zellzahlen mehrerer Experimente zusammengefasst. Die Werte geben die Anzahl der Reporterallel-exprimierenden Zellen pro Milz an.

Im naiven Zustand konnten bereits ca. 5×10^4 IL-12p40/GFP⁺ Zellen pro Milz ermittelt werden. Nach polyI:C Stimulation kam es zu einer Zunahme der IL-12p40/GFP Produzenten auf ca. $7,5 \times 10^4$ Zellen, wobei nur ca. 4×10^3 Zellen davon GFP⁺/YFP⁺ waren. Nach der Stimulation mit CpG2216 kam es zu einer IL-12p40/GFP Expression in ca. $1,4 \times 10^5$ Zellen in der gesamten Milz. Hier stellten GFP⁺/YFP⁺ Zellen ebenfalls nur einen sehr geringen Anteil mit ca. 7×10^3 Zellen der gesamten IL-12p40/GFP Produzenten dar (s. Abb. 2.28a).

Die Quantifizierung der IFN β /YFP Produzenten ergab eine absolute Gesamtzellzahl von ca. $1,6 \times 10^4$ Zellen nach polyI:C Stimulation, wobei hier die Mehrzahl der Zellen GFP⁻/YFP⁺ war (ca. $1,2 \times 10^4$) und nur ca. ein Viertel der Zellen bestand aus GFP⁺/YFP⁺ Zellen (ca. 4×10^3). Nach einer CpG2216 Stimulation kam es zu einer vergleichbar hohen Anzahl der IFN β /YFP Produzenten, wobei hier der Anteil der GFP⁺/YFP⁺ Zellen etwa 50 % ausmachte (s. Abb. 2.28b).

Weiterhin wurde zur besseren Darstellung die Frequenz der GFP⁺/YFP⁺ Zellen gesondert abgebildet (s. Abb. 2.28c). Diese Zellen wurden in die Berechnung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten in Abb. 2.28 a und b miteinbezogen.

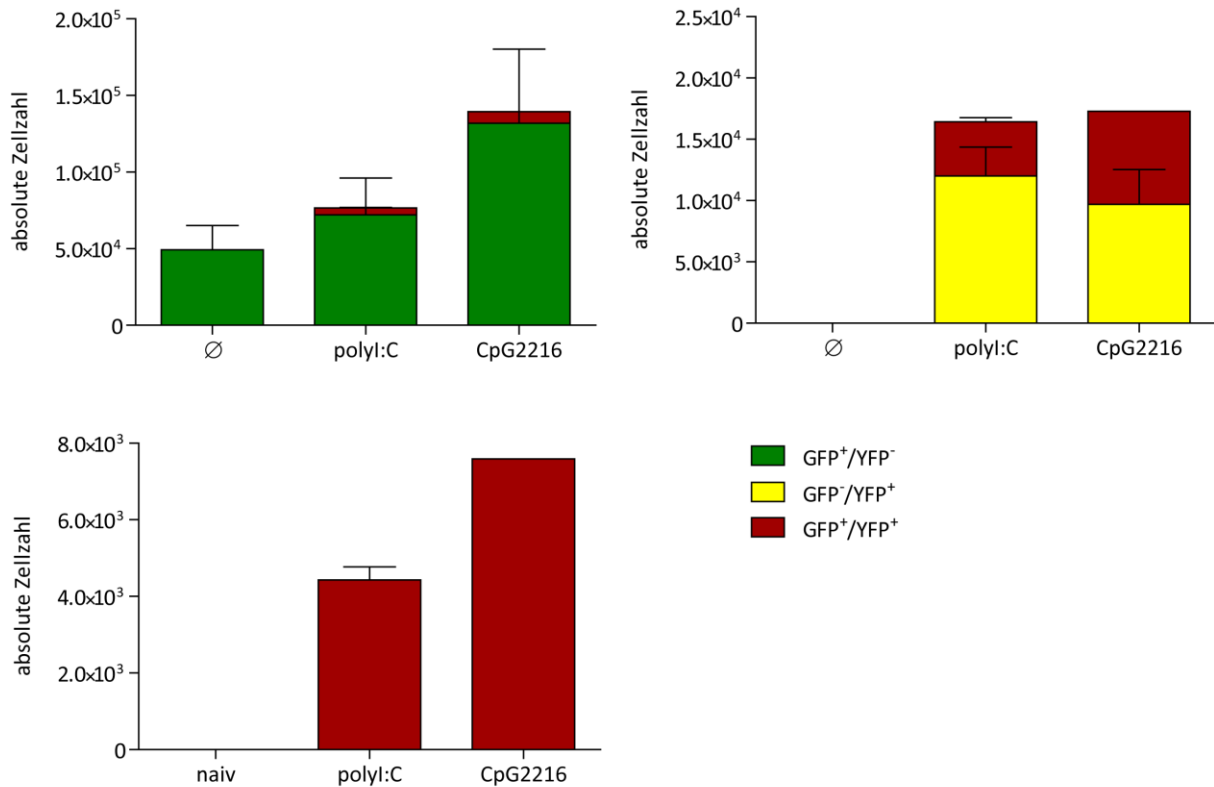


Abbildung 2.28 Quantifizierung der IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP Expression in der Milz.

Dargestellt ist der Vergleich der IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP Produzenten in naiven (s. Abb. 2.20), polyI:C (s. Abb. 2.24) und CpG2216 (s. Abb. 2.26) stimulierten IL-12p40^{get40/get40} x IFNβ^{mob/mob} Mäusen in der Milz.

Die statistische Auswertung der Reporterallel-exprimierenden Zellen nach Stimulation mit PAMPs konnte zeigen, dass es in Abhängigkeit vom verwendeten Stimulus zu einem differentiellen Expressionsmuster von IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP kommt. Hierbei bildeten die IL-12p40/GFP exprimierenden Zellen den höchsten Anteil der Reporterallel-exprimierenden Zellen. Diese wurden mit großem Abstand von den IFNβ/YFP Produzenten gefolgt. GFP⁺/YFP⁺ Zellen zeigten nur geringe Unterschiede in ihrer Anzahl verglichen mit den IFNβ/YFP⁺ Zellen, dennoch bildeten sie die kleinste der hier untersuchten Zellpopulationen. Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass nur wenige Zellen ein und derselben Zellpopulation in der Lage sind ein bestimmtes Zytokin zu produzieren. Diese Zellen stellen möglicherweise eine innerhalb einer bestimmten Zellpopulation alternativ differenzierte Zellpopulation dar, die sich auf die Produktion bestimmter Faktoren bzw. Zytokine spezialisiert hat.

2.2.3 *In Vitro* Charakterisierung der IL12p40/GFP und IFN β /YFP Expression

Die vorangehenden *in vivo* Analysen der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression während der CASP und nach PAMP Stimulation konnten vor allem cDCs als Hauptproduzenten beider Zytokine ausmachen. pDCs zeigten nur eine Expression von IFN β /YFP. Da cDCs in der Lage waren beide Zytokine simultan zu exprimieren, wurde die IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in GM-CSF DCs *in vitro* genauer untersucht. Weiterhin wurden die Reporterallel-exprimierenden Zellen auf mögliche funktionelle Unterschiede untersucht. Zur genaueren Analyse der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression während der CASP mit vorangehender polyI:C Stimulation wurde ein *in vitro* Modell etabliert, dass die Verfolgung einer möglichen Veränderung der Reporterallel-Expression im Versuchsverlauf auf Einzelzellebene ermöglichte.

2.2.3.1 *In vitro* Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression nach Stimulation mit definierten PAMPs

Zunächst wurde die IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in knochenmarksgenerierten GM-CSF DCs untersucht, da sie die Hauptproduktion der Reporterallele nach polyI:C und CASP-OP aufwiesen. Hierzu wurden die GM-CSF DCs mit verschiedenen PAMPs stimuliert und die Reporterallel-Expression mittels FACS bestimmt.

Die FACS-Analyse konnte zeigen, dass IL-12p40/GFP bereits unter basalen Bedingungen exprimiert wurde, wie auch schon für die *in vivo* Situation gezeigt werden konnte. Dabei produzierten 5 - 8 % der GM-CSF DCs das eGFP-Reporterallel. Die Stimulation mit polyI:C induzierte eine IL-12p40/GFP Expression in 14 – 18 % der Zellen. Zusätzlich kam es zu einer IFN β /YFP Expression in ca. 13 % der dargestellten Zellen. Die simultane Expression beider Reporterallele konnte in ca. 1,5 % der Zellen nachgewiesen werden. Somit wurden beide Reporterallele fast exklusiv exprimiert. Die Stimulation mit LPS führte hingegen zu einer hohen IL-12p40/GFP Expression in 35 – 45 % der GM-CSF DCs. Für IFN β /YFP konnte kein positives Signal detektiert werden. Eine starke IL-12p40/GFP Expression konnte ebenfalls nach Stimulation mit CpG2216 beobachtet werden. Hier wiesen 30 - 40 % der Zellen ein eGFP Signal auf. Weiterhin kam es zu einer geringen IFN β /YFP Expression in 0,2 – 0,7 % der Zellen. Diese waren gleichzeitig positiv für IL-12p40/GFP. Somit wiesen alle IFN β /YFP Produzenten eine simultane Expression von IL-12p40/GFP auf (s. Abb. 2.29).

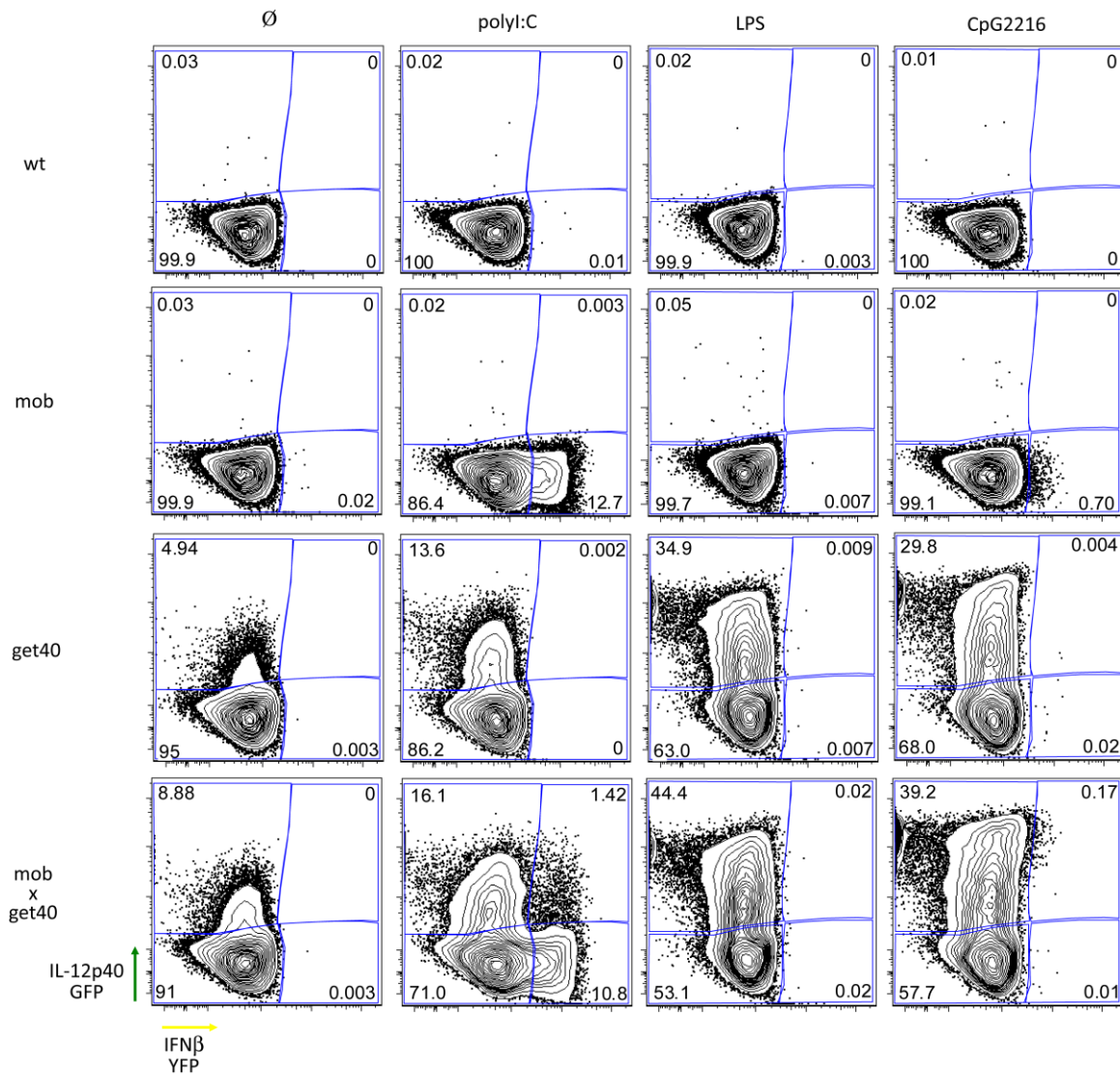


Abbildung 2.29 *In vitro* Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in GM-CSF DCs nach Stimulation mit PAMPs.

GM-CSF DCs von IL-12p40^{wt/wt} x IFN β ^{wt/wt}, IL-12p40^{wt/wt} x IFN β ^{mob/mob}, IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{wt/wt} und IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} wurden für 24 h mit polyI:C, LPS und CpG2216 stimuliert. Dargestellt sind lebende CD11c⁺ Zellen.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass es nach der Stimulation mit verschiedenen PAMPs zu einer differentiellen Expression der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Reporterallele kam. Dies bestärkt die Annahme, dass eine phänotypisch identische, also homogene Zellpopulation, möglicherweise in funktionell unterschiedliche Subpopulationen eingeteilt werden kann.

2.2.3.2 Funktionelle Analyse sortierter GM-CSF DCs basierend auf ihrer Reporterallel-Expression

Die PAMP Stimulation von GM-CSF generierten DCs konnte die Ergebnisse der *in vivo* Analysen im Bezug auf eine überwiegend differentielle Expression von IFN β /YFP und IL-12p40/GFP bestätigen. Durch die immunhistochemische Lokalisierung der Reporterallel-exprimierenden Zellen in unterschiedlichen funktionellen Arealen der Milz sollte überprüft werden, ob die IL-12p40/GFP und IFN β /YFP produzierenden Zellen möglicherweise funktionelle Unterschiede aufweisen. Hierzu wurden polyI:C stimulierte und auf der Basis ihrer IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression sortierte GM-CSF DC Subpopulationen auf die Expression verschiedener PRRs und ihre T Zell stimulatorische Kapazität hin untersucht.

Zur Bestimmung der Reinheit der sortierten Zellen wurde die IFN β und IL-12p40 Expression in den erhaltenen vier Zell-Populationen bestimmt. Eine IFN β Expression wurde vor allem in der GFP $^-$ /YFP $^+$ sortierten Zellpopulation ermittelt. Die Expression betrug einen 1200 fachen Anstieg relativ zu naiven GM-CSF DCs. Weiterhin konnte eine ca. 500 fach höhere Expression der IFN β mRNA in den GFP $^+$ /YFP $^+$ Zellen und eine ca. 300 fach höhere Expression in den GFP $^+$ /YFP $^-$ sortierten Zellpopulationen ermittelt werden (Abb. 2.30a). Im Bezug auf die IL-12p40 Expression konnte eine ca. 4500 und 5000 fache Heraufregulation in den GFP $^+$ /YFP $^-$ und GFP $^+$ /YFP $^+$ sortierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 2.30a). Somit konnte gezeigt werden, dass eine hohe Reinheit der Reporterallel-exprimierenden Zellen vorlag.

Die Analyse der Expression verschiedener PRRs ergab eine differentielle Expression in den sortierten Zellpopulationen. So wiesen GFP $^-$ /YFP $^+$ sortierte Zellen, und damit exklusive IFN β Produzenten, die höchste Expression sowohl von TLR3 (4000 x) als auch MDA5 (35000 x) auf. Im Gegensatz dazu zeigten die GFP $^-$ /YFP $^-$, GFP $^+$ /YFP $^-$ und GFP $^+$ /YFP $^+$ Zellpopulationen deutlich niedrigere Expressionswerte (2000 x und 25000 x). Die höchste TLR9 Expression wurde hingegen in GFP $^+$ /YFP $^+$ (8000 x) und GFP $^+$ /YFP $^-$ (7000 x) Zellen detektiert, die IL12p40 produzierten (Abb. 2.30b).

Die weitere funktionelle Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP exprimierenden Zellen mittels T Zell Proliferationsassay konnte, sowohl im Fall der 3 [H]T-Inkorporation, als auch der IL-2 Konzentrationsmessung GFP $^+$ /YFP $^-$ und GFP $^+$ /YFP $^+$ sortierte Zellen als die kompetentesten T Zell Stimulatoren ermitteln. Beide Populationen wiesen vergleichbare Inkorporationswerte des radioaktiv markierten Thymidins und ebenfalls eine vergleichbare Produktion vom durch T Zellen sekretiertem IL-2 auf (Abb. 2.30c). Die Bestimmung der Oberflächenexpression des kostimulatorischen Moleküls CD86 und von I-A b (MHCII) korrelierte mit der Fähigkeit der IL-12p40/GFP $^+$ und IFN β /YFP $^+$ Zellen T Zell Proliferation zu stimulieren (Abb. 2.30d). Hierbei zeigten GFP $^+$ /YFP $^-$ und GFP $^+$ /YFP $^+$ Zellen die jeweils höchsten Expressionen für CD86 und I-A b , gefolgt von den GFP $^-$ /YFP $^+$ Zellen.

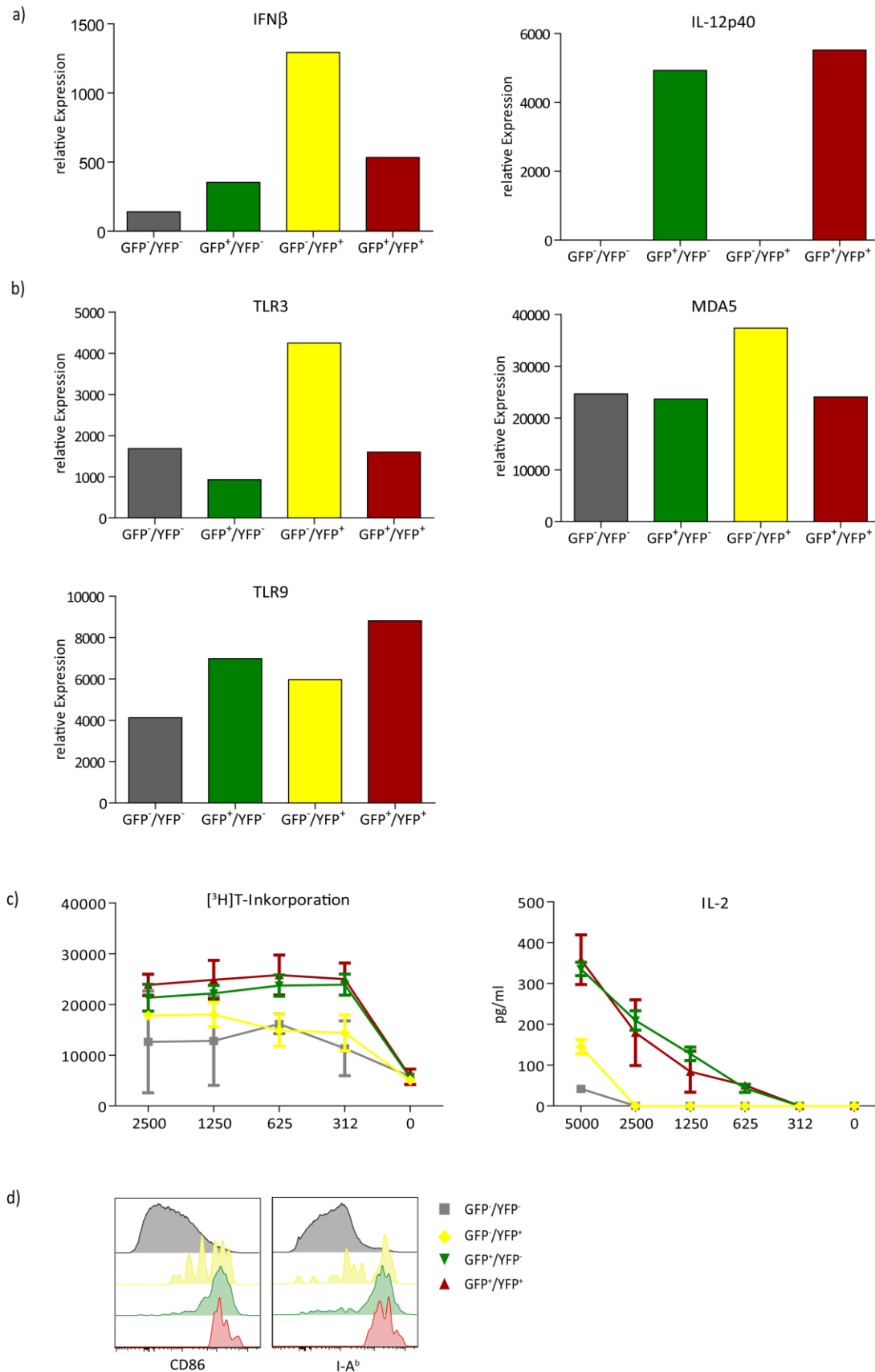


Abbildung 2.30 Untersuchung der Funktionalität der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP produzierenden GM-CSF DCs.

GM-CSF DCs von IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} wurden für 24 h mit polyI:C stimuliert. Anschließend wurden sie gemäß ihrer Reporterallel-Expression in die vier entsprechenden Populationen sortiert. a) Die mRNA-Expression für IFN β und IL-12p40 diente als Reinheitskontrolle der sortierten Zellen. b) Bestimmung der

mRNS-Expression verschiedener PRRs. c) Sortierte GM-CSF DCs wurden mit OT-II T Zellen in verschiedenen Konzentrationen kokultiviert. Die T Zell stimulatorische Kapazität wurde mittels IL-2 ELISA und [³H]-Inkorporation bestimmt. [d] Charakterisierung der Oberflächenexpression von CD86 und I-A^b auf GM-CSF DCs von IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} Mäusen nach polyI:C Stimulation.

Diese Ergebnisse konnten die Vermutung der unterschiedlichen Funktionalität der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP exprimierenden Zellen bestätigen. Die Reporterallel exprimierenden Populationen zeigten eine differentielle Expression von PRRs, was die unterschiedlichen Expressionsmuster der *in vitro* PAMP Stimulation erklärt, denn nicht jede Zelle innerhalb dieser an sich homogenen Population ist in der Lage in der gleichen Art und Weise auf den gegebenen Stimulus zu antworten. Weiterhin besaßen die jeweiligen Reporterallel-exprimierenden Populationen eine unterschiedlich starke Kapazität T Zell Proliferation zu induzieren. So konnte belegt werden, dass die Zytokinexpressionsprofil einer Zelle Rückschlüsse auf die Funktion dieser Zelle erlaubt.

2.2.3.3 *In vitro* Restimulation sortierter IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Zellpopulationen mit definierten PAMPs

In den vorangehenden *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass es nach polyI:C Stimulation zu einer Induktion der Expression von IL-12p40/GFP und IFN β /YFP durch cDCs kommt. Weiterhin kam es auch im Verlauf der CASP ebenfalls zu einer Expression der Reporterallele in cDCs. Um den Verlauf der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression nachverfolgen und verstehen zu können wurde ein *in vitro* Restimulationsmodell etabliert, das es ermöglicht die Reporterallel Expression in den einzelnen Reporterallel-exprimierenden Populationen nachzuverfolgen. Dabei wurden GM-CSF DCs mit polyI:C stimuliert und auf der Grundlage ihrer IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression sortiert. Die erhaltenen Subpopulationen wurden rekultiviert, nach einer Ruhephase restimuliert und ihre Reporterallel Expression durchflusszytometrisch erneut analysiert.

Dieses Modell erlaubte es die Frage zu beantworten, ob die Zellen die durch polyI:C zu einer IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression stimuliert wurden, während der CASP mit diesem Expressionsprofil fortfahren oder ob es zu einer Umprogrammierung dieser Zellen kommt.

Die Analyse der aufgrund ihrer Reporterallel-Expression sortierten Zellen zeigte, dass die einzelnen Subpopulation erneut Unterschiede in der Antwort auf unterschiedliche PAMPs aufwiesen. GFP⁻/YFP⁻ und GFP⁻/YFP⁺ sortierte Zellen wiesen dabei ähnliche Antworten auf. So kam es nach nicht erfolgter Restimulation zu keinerlei Veränderung in der GFP und YFP Expression. Nach einer wiederholten Restimulation mit polyI:C kam es nur zu einer sehr geringen Induktion von IL-12p40/GFP. GFP⁻/YFP⁻ Zellen zeigten nach polyI:C Stimulation einen Anstieg der GFP Expression von 2 % auf 4 % und GFP⁻/YFP⁺ Zellen von 1,5 % auf 2,5 %. Die Restimulation mit den bakteriellen PAMPs CpG2216 und LPS führte jedoch zu einer deutlichen Induktion der IL-12p40/GFP Expression. Hier konnten bei den GFP⁻/YFP⁻ sortierten Zellen ca. 14 % IL-12p40/GFP⁺ Zellen detektiert werden und im Fall der GFP⁻/YFP⁺ Zellen wurden ca. 4 – 4,5 % IL-12p40/GFP⁺ Zellen ermittelt (s. Abb. 2.31).

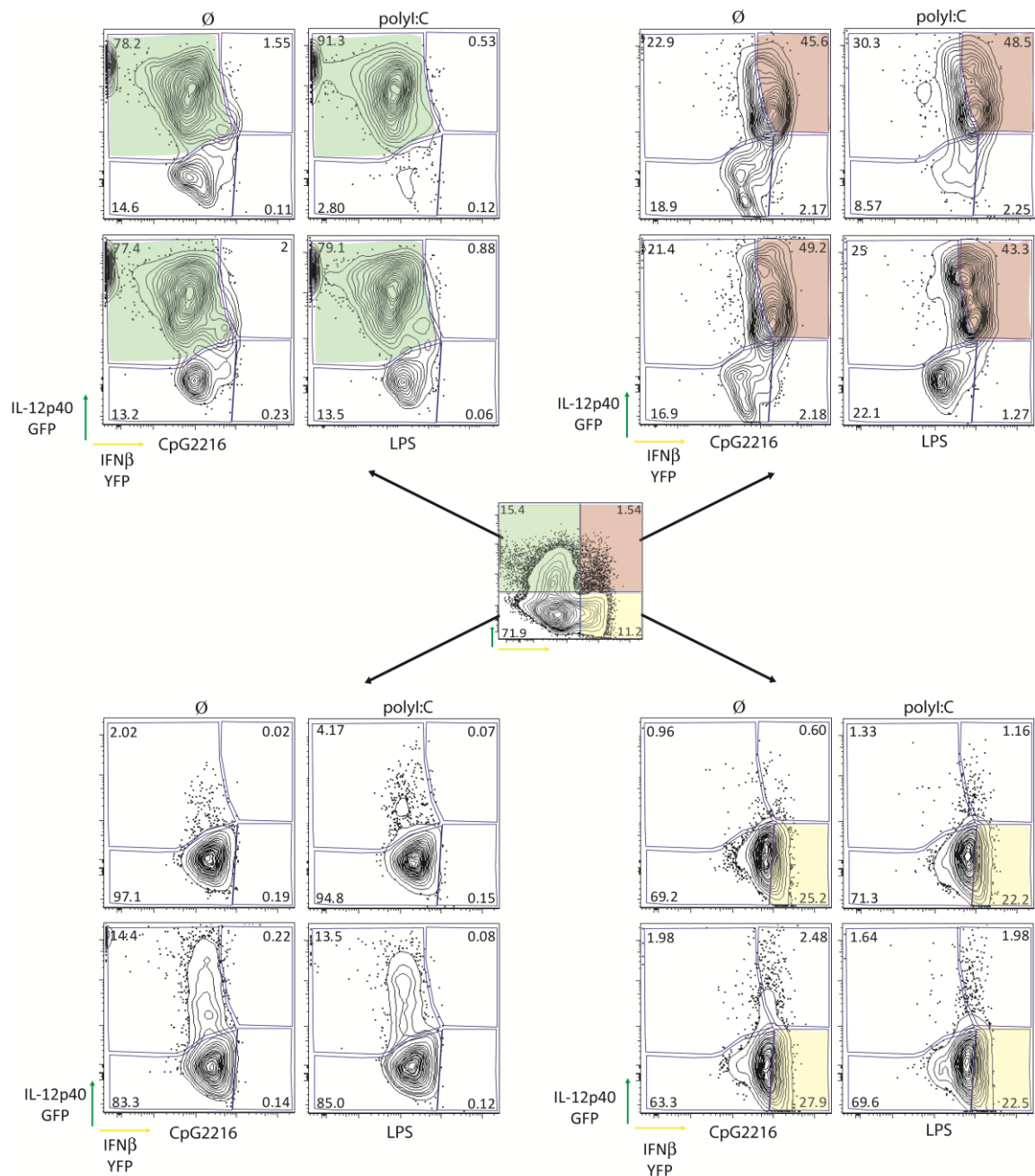


Abbildung 2.31 Untersuchung der Plastizität der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression nach Vorstimulation mit PAMPs.

GM-CSF DCs wurden 24 h mit polyI:C stimuliert, gemäß ihrer Reporterallel-Expression sortiert und rekultiviert. Nach 36 h Ruhezeit wurden die Zellen unstimuliert belassen oder 24 h mit polyI:C, CpG2216 oder LPS restimuliert. Anschließend wurde die Expression von IL-12p40/GFP und IFN β /YFP analysiert.

Im Gegensatz dazu zeigten die GFP⁺/YFP⁻ und GFP⁺/YFP⁺ sortierten Subpopulationen keinerlei Veränderung in ihrem Expressionsprofil von GFP und YFP auf. Sie behielten die Reporterallel Expression auf deren Grundlage sie sortiert wurden unter allen Restimulationsbedingungen (s. Abb 2.31).

Die *in vitro* Restimulation von sortierten, Reporterallel-exprimierenden GM-CSF DC Subpopulationen konnte zeigen, dass die meisten Zellen in ihrem Expressionsprofil von GFP und YFP festgelegt waren.

Die meisten Zellen exprimierten nur das Reporterallel, auf dessen Grundlage sie sortiert wurden. Damit scheinen DCs, die einmal ein bestimmtes Zytokinexpressionsprofil aufweisen nach einer Restimulation nur in wenigen Fällen zusätzliche Faktoren bzw. Zytokine zu exprimieren. Dies lässt den Schluss zu, dass sie untereinander funktionell spezialisiert und dadurch in ihrem Expressionsprofil eingeschränkt sind.

2.2.3.4 *In vivo* Restimulation sortierter IL-12p40/GFP⁺ und IFN β /YFP⁺ Zellpopulationen durch CASP

Um die Annahme in einer *in vivo* Situation zu überprüfen, dass DCs, die einmal zu einer bestimmten Reporterallel-Expression stimuliert wurden, diese beibehalten, wurden polyI:C stimulierte und sortierte GM-CSF DC Subpopulationen in Rezipienten Mäuse intravenös transferiert. Nach einer Ruhephase wurden die Rezipienten CASP operiert und die Reporterallel-Expression 24 h später durchflusszytometrisch analysiert. Um die transferierten Zellen identifizieren zu können, wurden die GM-CSF DCs aus IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob}, den kongenen Marker CD45.2 exprimierenden, Mäusen generiert. Diese wurden in IL-12p40^{wt/wt} x IFN β ^{wt/wt} Rezipienten transferiert, die zur Unterscheidung eine CD45.1 Expression auf Zellen des hämatopoetischen Systems aufwiesen (s. Abb. 2.32a).

Die *in vivo* Restimulation von Reporterallel exprimierenden GM-CSF DC Subpopulationen mittels CASP konnte die Ergebnisse der *in vitro* Restimulation bestätigen. In Rezipienten, die GFP⁻/YFP⁻ sortierte Zellen erhielten, konnte keine deutliche Reporterallel Expression nachgewiesen werden. Weiterhin wiesen Rezipienten, die GFP⁺/YFP⁻ oder GFP⁻/YFP⁺ sortierte GM-CSF DCs erhielten nur die jeweils transferierte Reporterallel Expression auf. Rezipienten die GFP⁺/YFP⁺ Zellen erhielten, zeigten aufgrund der geringeren transferierten Zellzahl kein positives GFP/YFP Signal (s. Abb. 2.32b).

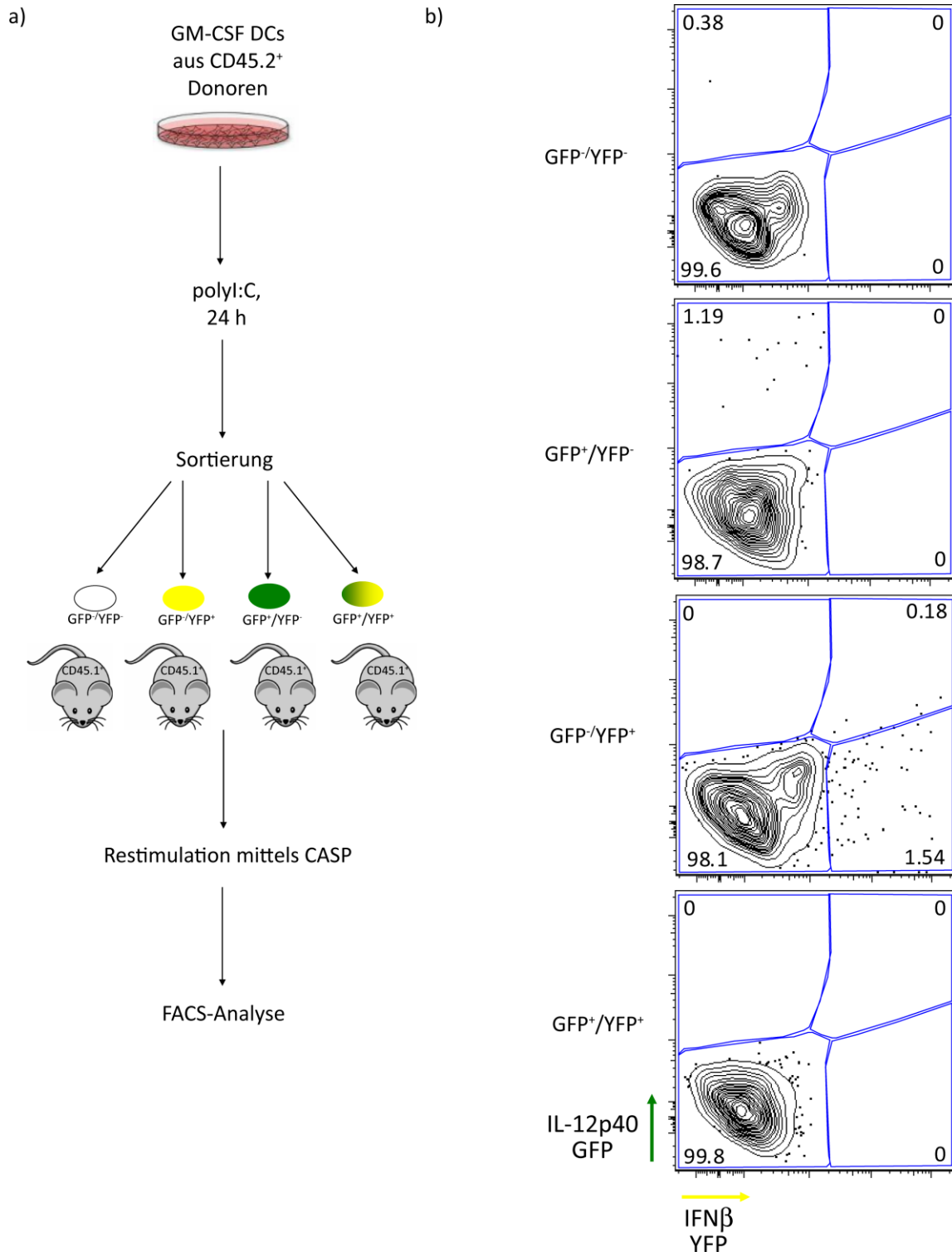


Abbildung 2.32 *In vivo* Restimulation von transferierten IL-12p40/GFP und IFN β /YFP exprimierenden GM-CSF DCs.

GM-CSF DCs (CD45.2⁺) wurden 24 h polyI:C stimuliert, gemäß ihrer Reporterallel-Expression sortiert und anschließend wurden 5×10^5 Zellen bzw. $2,5 \times 10^5$ (GFP⁺/YFP⁺) in naive Rezipienten (CD45.1⁺) transferiert. Nach 12 h wurden die Rezipienten CASP operiert und nach 24 h die IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in CD45.2⁺ Zellen in der Milz mittels FACS bestimmt.

Die hier durchgeführten Restimulationsexperimente konnten zeigen, dass DCs selbst in einer phänotypisch homogenen Population funktionelle Unterschiede aufweisen und auf eine Stimulation hin ein differentielles Expressionmuster von Zytokinen aufweisen. Das heißt, dass diese Zellen

funktionell eingeschränkt sind und wenig plastisch auf eine mögliche Restimulation bzw. zusätzliche Infektion antworten können.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass DCs eine wichtige Rolle in der frühen Immunantwort einer polymikrobiellen Peritonitis spielen. Durch die Produktion essentieller Zytokine modulieren sie die ablaufende Immunantwort. Kommt es jedoch im Zuge einer akuten Virusinfektion zu einer polymikrobiellen Peritonitis sind die DCs zu unflexibel, um auf den neuen Stimulus optimal zu reagieren und sind funktionell fixiert. Dies kann möglicherweise zu einem detrimental Ausgang der Erkrankung führen. Weiterhin konnte dargestellt werden, dass selbst innerhalb homogener DC Populationen funktionell unterschiedliche Subpopulationen existieren. Diese konnten aufgrund ihrer Oberflächenmarkerexpression nicht weiter unterschieden werden, so dass die Zytokinexpression zu einer genaueren Charakterisierung verschiedener Populationen hinzugezogen wurde. Funktionelle Analysen konnten eine Korrelation zwischen differentieller Zytokinexpression und Funktion aufzeigen.

3. Diskussion

3.1 Untersuchung der IFN β Expression in einem Autoimmun-Modell

Die MS ist eine inflammatorische, demyelinisierende Erkrankung des ZNS, deren neuroimmunologische Grundlagen durch das Modell der EAE weitestgehend untersucht werden können (Owens et al., 2001). Das bessere Verständnis der EAE und somit der MS soll die Entwicklung neuer Therapiestrategien der MS ermöglichen. In der Vergangenheit konnten Erkenntnisse, die im Tiermodell eingehend untersucht wurden, erfolgreich in eine MS-Therapie übertragen werden. So wurde z.B. der blockierende monoklonale Antikörper gegen das α_4 -Integrin (Natalizumab) und seine positive Wirkung auf den klinischen Verlauf in der EAE im Tiermodell erstmals untersucht und dann in der MS-Therapie erfolgreich eingesetzt (Miller et al., 2003; Yednock et al., 1992). Die meistangewandte Therapie der RRMS besteht in der Applikation von rekombinantem IFN β . Wie bereits beschrieben verfügt es über pleiotrope antivirale und immunmodulatorische Wirkungsmechanismen und ist wahrscheinlich deshalb das bisher erfolgreichste Therapeutikum der MS (s. Abschnitt 1.8.2).

Schließlich wurde auch gezeigt, dass IFN β während der EAE endogen im Rückenmark am Höhepunkt der Krankheit exprimiert wird, jedoch nicht in der Peripherie (Prinz et al., 2008). Die Identität der für die IFN β Expression verantwortlichen Zellen blieb jedoch weiterhin unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es die IFN β -Produzenten am Höhepunkt der EAE und nach TLR Stimulation mit Hilfe des bicistronischen IFN β /YFP Reportermaus-Modells auf Einzelzellebene zu identifizieren und ihre Frequenz, sowie Lokalisation zu bestimmen (Scheu et al., 2008).

3.1.1 *In vivo* und *in vitro* Analyse der IFN β produzierenden Zellen in der EAE

Zur Identifizierung und Lokalisierung der IFN β -Produzenten wurde das bereits beschriebene bicistronische IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Reporter-Mausmodell verwendet (Scheu et al., 2008). Bisher wurde nur die Expression von IFN β im Rückenmark, jedoch nicht in der Peripherie am Höhepunkt der Krankheit nachgewiesen (Prinz et al., 2008). Diese Daten beruhen jedoch nur auf mRNA Expressionsanalysen und Proteinnachweis in Lysaten des gesamten Organs. Die Höhe der Produktion korrelierte in dieser Studie mit dem Krankheitsgrad. So wiesen Tiere mit einem Score von 0 nur ca. 20 pg/ml IFN β in Rückenmarkshomogenaten auf, während in Tieren mit einem Score von > 1,5 ca. 150 pg/ml in Rückenmarkshomogenaten detektiert wurden. Gleichzeitig zeigte diese Studie durch eine differentielle Expression des IFNAR auf verschiedenen Zellpopulationen, dass myeloide Zellen, wie M Φ und Mikroglia, das Ziel des im ZNS produzierten IFN β sind. Die Arbeit von Prinz *et al.*, konnte im Vergleich zu den hier dargestellten Ergebnissen, jedoch keine Rückschlüsse auf die IFN β Produzenten im ZNS während der EAE ziehen. Über die Identität der IFN β Produzenten wurden bis dato viele Spekulationen angestellt. Bisher wurden pDCs als IFN β Produzenten während der EAE favorisiert, da sie als professionelle Typ I IFN produzierende Zellen gelten (Asselin-Paturel et al., 2001). Während der EAE immigrierten sie aus der Peripherie ins ZNS und waren in der Lage den Verlauf der Krankheit positiv zu beeinflussen (Bailey-Bucktrout et al., 2008). Weitere potentielle IFN β Produzenten waren Neurone, die während einer viralen Infektion eine IFN β und IFN α Expression aufwiesen (Delhaye et

al., 2006). Diese Studie konnte die Typ I IFN Antwort jedoch nur mittels RNS *in-situ*-Hybridisierung, aber nicht auf Einzel-Zellebene nachweisen. Die nahe Verwandtschaft mit M Φ und ihre starke Ähnlichkeit im Bezug auf ihren Phänotyp und ihre Funktion ließen den Schluss zu, dass auch Mikroglia zur IFN β Produktion in der Lage seien, wie es in verschiedenen Infektionsmodellen für M Φ bereits gezeigt werden konnte (Gratz et al., 2011; Town et al., 2006). In der Milz und den peripheren Lymphknoten konnte keine IFN β /YFP Expression nachgewiesen werden (Abb. 2.3). Im Gegensatz dazu konnte eine homogene IFN β /YFP⁺ Zellpopulation im Rückenmark und Gehirn, die CD45^{int}, CD11b⁺ exprimierte, nachgewiesen werden (Abb. 2.4). Somit identifizierte dieses Oberflächenmarker-Expressionsprofil Mikroglia als IFN β /YFP-Produzenten am Höhepunkt der EAE. Da Mikroglia hämatopoetischen Ursprungs sind, weisen sie die Expression des hämatopoetischen Markers CD45 auf (Ginhoux et al., 2010; Sedgwick et al., 1991). So lassen sich Mikroglia von anderen ZNS-residenten Populationen unterscheiden. Durch die intermediäre Expression dieses Markers lassen sie sich zusätzlich von immigrierten CD45^{high} exprimierenden Zellen wie den M Φ und den DCs unterscheiden. Basierend auf der durchflusszytometrischen Analyse ergab die Berechnung der absoluten Zellzahl der IFN β /YFP Produzenten, dass nur eine sehr geringe Anzahl von Zellen IFN β /YFP während der EAE produzierte. Im Rückenmark waren es ca. 400 und im Gehirn nur ca. 20 Zellen pro Organ (Abb. 2.4 c). Der prozentuale Anteil der CD45^{int}, CD11b⁺ Zellen der IFN β /YFP Produzenten lag in beiden Fällen bei etwa 95% (Abb. 2.4.c). Dieses Resultat wurde durch die Bestimmung der IFN β RNS-Expression in sortierten ZNS-Populationen untermauert (Abb. 2.5). Die höhere IFN β Expression im Rückenmark spiegelt wider, dass es während der EAE den Hauptreaktionsort der ablaufenden pathologischen Prozesse darstellt (Gold et al., 2000). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass nicht jede Maus IFN β /YFP an d17, dem zu erwartendem Höhepunkt der Krankheit, exprimierte. Mäuse, die keinerlei Symptome aufwiesen, wiesen auch keine IFN β /YFP Expression auf, während Mäuse die hochgradig erkrankt waren, auch die höchste IFN β /YFP Expression aufwiesen. Diese Beobachtungen reflektieren die hohe Variabilität und Komplexität des EAE-Modells. Die genaue Lokalisierung der IFN β /YFP Produzenten innerhalb des Gewebes konnte aufgrund der hohen Autofluoreszenz im ZNS histologisch nicht genauer bestimmt werden, da das IFN β /YFP Signal nur sehr schwach ist. Außerdem wiesen erkrankte Tiere nicht in jedem Fall eine IFN β /YFP Expression oder zum Teil eine sehr schwache IFN β /YFP Antwort auf. Aufgrund der hohen Variabilität dieses komplexen Krankheitsmodells, ist es möglich, dass nicht in jeder Maus eine protektive IFN β /YFP Antwort induziert wird. Weiterhin ist es möglich, dass die produzierte Menge an IFN β so gering ist, dass das mob-Reportermausmodell an sein Detektionslimit bringt.

In den letzten Jahren wuchsen die Hinweise darauf den Verlauf der MS durch den Einsatz von TLR Liganden positiv beeinflussen zu können. Diese Idee basierte auf den Beobachtungen, dass unterschiedliche TLR Stimulationen im Verlauf der EAE eine detrimetelle oder protektive Immunantwort vermittelten (Racke and Drew, 2009). Mikroglia exprimieren basal, aber vor allem am Höhepunkt der EAE die TLRs 1-9 (Olson and Miller, 2004; Prinz et al., 2006). Ihre Bedeutung für die EAE hängt jedoch sehr stark vom verwendeten EAE Modell ab, so dass die bisherigen Resultate nicht direkt vergleichbar sind. So wurde für TLR9 in der MOG₃₅₋₅₅ induzierten EAE gezeigt, dass dieses Molekül für eine effektive Initiation der EAE wichtig ist, obwohl die gleichzeitige Anwesenheit von CpG DNS im Immunisierungsinokulum nicht detektiert werden konnte. Daher liegt hier die Vermutung nah, dass endogene krankheitsfördernde TLR9 Liganden zur Etablierung der Krankheit

beitragen könnten. Im Gegensatz dazu wies die Stimulation von TLR3 und TLR7 einen protektiven Effekt auf. Die Stimulation des TLR3 mittels polyI:C bzw. viraler dsRNS und des TLR7 mit Imiquimod bzw. viraler ssRNS induzierte die Expression des protektiven IFN β . Diese vermittelte eine geringere Demyelinisierung, wie auch eine geringere Infiltration des ZNS (O'Brien et al., 2010; Touil et al., 2006). Weitere Studien konnten endogene als auch synthetische Liganden für TLR3 identifizieren, die ebenfalls einen protektiven Effekt in der EAE, aber auch in der MS ausübten (Bsibsi et al., 2010; Downer et al., 2011). Trotz allem blieb jedoch ungeklärt, welche Zellpopulation für die IFN β Produktion während der EAE nach erfolgter TLR3 Stimulation verantwortlich ist.

Die *in vitro* Restimulation intrazerebraler Leukozyten von Mäusen am Höhepunkt der EAE mit dem TLR3/MDA5 Agonisten polyI:C und dem TLR7 Agonisten wobble DNS konnte auch hier residente Mikroglia als IFN β /YFP produzierende Population identifizieren (Abb. 2.6). Zusätzlich wiesen CD45^{high}, CD11b⁺ Zellen eine IFN β /YFP Expression auf, was auf die Fähigkeit von M Φ und DCs, IFN β nach TLR3 Stimulation zu produzieren, zurückzuführen ist (Scheu et al., 2008). Die zu diesem Zweck eingesetzten Zellen wiesen nach einer Reaktivierungs- und Restimulationszeit von 24 h im nicht restimulierten Fall keine IFN β /YFP Expression auf, so dass die IFN β /YFP Expression der Stimulation mit den hier erwähnten PAMPs zuzuschreiben war. Somit konnte gezeigt werden, dass eine TLR3 Stimulation in intrazerebralen Leukozyten aus EAE induzierten Mäusen zu einer IFN β Produktion in residenten Mikroglia und in immigrierten APZ wie M Φ beiträgt. Diese Erkenntnisse könnten für eine zell-gerichtete Immuntherapie eingesetzt werden und Mikroglia und immigrierte APZ könnten spezifisch am Ort des Geschehens, dem ZNS, zur IFN β Produktion angeregt werden. Es wäre ebenso möglich, intrathekale Applikationen von TLR Agonisten durchzuführen, um eine systemische Gabe und eine proinflammatorische Antwort in der Peripherie zu verhindern.

3.1.2 Vergleich der IFN β mRNA Expression zwischen Peripherie und ZNS im Verlauf der EAE

Bisher veröffentlichte Ergebnisse zeigen eine IFN β Expression nur am Höhepunkt der Krankheit und nur im ZNS (Prinz et al., 2008). Somit gibt es keinerlei Daten zur IFN β Expression im Verlauf der EAE und auch keine Erkenntnisse darüber, ob IFN β auch in anderen Organen exprimiert wird. Die Analyse der IFN β Expression im Verlauf der EAE zeigte eine frühe IFN β Antwort in der Initiationsphase in der Peripherie und eine IFN β Expression in der Effektorphase, die auf das ZNS beschränkt war (Abb. 2.7). Die frühe IFN β Expression in der Peripherie lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Anwesenheit von mikrobiellen Stimuli des Adjuvants im Immunisierungsinokulum zurückführen. Dieses besteht unter anderem aus abgetötetem *Mycobacterium tuberculosis*, welches als Adjuvants zur Induktion der angeborenen Immunantwort dient. Über die Relevanz dieser IFN β Expression lässt sich nur spekulieren. In der Initiationsphase wird eine Immunantwort in der Peripherie induziert. Das subkutan verabreichte Inokulum wird von residenten APZs vor allem in die drainierenden Lymphknoten transportiert. Es kann jedoch auch über die Verbindung des Lymph- und Blutkreislaufs in die Milz gelangen. Hier kommt es nun zur IFN β Expression durch entsprechende APZ. Aufgrund der protektiven Effekte, die IFN β in der EAE vermittelt, könnte es auch hier protektiv wirken und der Initiation der EAE entgegenwirken. Es wurde beschrieben, dass IFN β zur Induktion der IL-10 Expression führt, welches eine starke antiinflammatorische Wirkung vermittelt (Tuohy et al., 2000). So inhibiert IFN β z.B. die IL-17a Produktion in T_H17 Zellen, die eine wichtige Effektor-Zellpopulation

darstellen (Zhang et al., 2011). Möglicherweise trägt dieser Effekt dazu bei, dass die EAE nicht in 100 % der immunisierten Mäuse ausgelöst wird.

Im weiteren Verlauf wurde zu Beginn der Effektorphase die IFN β Expression in der Peripherie herunterreguliert und gleichzeitig wurde sie im ZNS induziert. Somit war die IFN β Expression zwischen Peripherie und ZNS gegenläufig reguliert. Die dargelegten Ergebnisse zeigen eine IFN β Expression während der ganzen Effektorphase im ZNS und weisen eine höhere Expression im Rückenmark, dem Hauptort der Immunreaktion verglichen mit dem Gehirn auf. In der Effektorphase, im ZNS, tragen mit großer Wahrscheinlichkeit endogene Liganden zu einer IFN β Expression bei, da hier sterile Bedingungen herrschen. Möglicherweise kommt es zu einer Aktivierung des TLR9 durch die Freisetzung und anschließender Endozytose von DNS apoptotischer T Zellen, die zur Aktivierung der IFN β Transkription führen können. Diese Vermutung basiert auf dem Befund, dass auch Vertebraten-DNS, die endozytiert wird zu einer Typ I IFN Antwort führen kann (Yasuda et al., 2005). Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal die IFN β Expression im Verlauf der EAE und, dass eine IFN β Antwort nicht nur im ZNS vorliegt, sondern auch in den sekundären lymphatischen Organen. Zur Untermauerung der mittels qRT-PCR gewonnenen Daten zur IFN β Expression im Verlauf der EAE, wurde die IFN β /YFP Expression mittels Durchflusszytometrie untersucht. Leider konnte ein positives Signal nur an d17 der Erkrankung festgestellt werden. Dies könnte auf einer zu niedrigen Sensitivität des IFN β ^{mob/mob} Reporter-Mausmodells beruhen. Die Analyse des IFN-stimulierten Gens (ISG)56 korreliert vor allem mit der IFN β Expression im ZNS (Abb. 2.8). Möglicherweise war die IFN β Antwort in der Milz zu gering, um eine aussagekräftige ISG56 Expression zu detektieren. ISGs werden durch eine IFN Antwort induziert und werden daher oft als Indikator für eine effektive IFN Antwort verwendet (Guo et al., 2000; Terenzi et al., 2007).

Die Beschreibung weiterer für die EAE bedeutender Zytokine wurde repräsentativ für die sekundären lymphatischen Organe in der Milz und repräsentativ für das ZNS im Rückenmark durchgeführt (Abb. 2.9 + 2.10). Auch hier konnte eine differentielle Expression verschiedener Gene festgestellt werden. Die Auswahl der untersuchten Gene erfolgte anhand ihrer hohen Relevanz für den Verlauf der EAE. Es wurden vor allem T Zell-assoziierte Gene untersucht, da die EAE eine CD4⁺ T Zell vermittelte Autoimmunerkrankung darstellt. CD3 ϵ diente als Pan-T Zell-Marker zur Kontrolle der Anwesenheit von T Zellen. Es ist Teil des T Zell-Rezeptors (TZR) und ist für die TZR Signalweiterleitung essentiell. Weiterhin wurden die Transkriptionsfaktoren FoxP3, T-bet und ROR γ t als T Zelllinien spezifische Gene untersucht, um die T Zell Antwort genauer zu definieren. FoxP3 definiert T_{reg}, T-bet T_H1 und ROR γ t T_H17 Zellen. Die Zytokine IFN γ , IL-17a, GM-CSF und IL-23p19 wurden zusätzlich analysiert, um auch das Zytokinmilieu, in dem die IFN β Induktion stattfindet näher zu beschreiben. In der Initiationsphase wurde eine Abnahme der T Zellen bzw. der CD3 ϵ Expression in der Milz detektiert (Abb.2.8). Dies könnte auf die Auswanderung der T Zellen aus der Milz zurückzuführen sein, da ihre Migrationseigenschaften durch die gleichzeitige Gabe von PTX bei der Immunisierung gestört sind. PTX inhibiert G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren (Yokomizo et al., 1997). Weiterhin wurde beschrieben, dass PTX zur Apoptose von T_{regs} führt, was auch hier zu einer Abnahme der T Zellen in der Milz beiträgt (Chen et al., 2006). Gleichzeitig kam es vor allem zur Induktion des T_H17 Zytokins IL-17a und des T_H17-assoziierten IL-23p19. Dies deutet daraufhin, dass hier eine T_H17 Antwort durch die Immunisierung induziert wurde, was mit dem Befund korreliert, dass PTX auch in der Lage ist eine IL-17 Antwort zu induzieren (Andreasen et al., 2009). Möglicherweise ist diese initiale

proinflammatorische Antwort wichtig für die Induktion der EAE. Es konnte hier keine signifikante Expression für IFN γ , T-bet, ROR γ t und GM-CSF in der Milz nachgewiesen werden. Die Expressionsanalyse des FoxP3 konnte zeigen, dass es zu einer hohen Induktion in der späten Effektorphase kam, was darauf hindeutet, dass T_{regs} vor allem in der Remissionsphase expandieren und hier von großer Bedeutung sind. Diese können nun zu einer Abschaltung der vorherrschenden Immunantwort beitragen (Sakaguchi et al., 1995). Lange Zeit wurden T_H1 Zellen (T-bet), die das proinflammatorische IFN γ produzieren, als die krankheitsvermittelnde Zellpopulation angesehen. Diese Annahme wurde durch die IL-17a produzierenden T_H17 Zellen (ROR γ t) als krankheitsvermittelnde T Zellpopulation abgelöst, da IL-23 und nicht IL-12 vorerst als das EAE-fördernde Zytokin identifiziert wurde (Becher et al., 2002; Cua et al., 2003; Murphy et al., 2003). Schließlich konnte gezeigt werden, dass GM-CSF das essentielle Zytokin für die Vermittlung der EAE ist und von T Zellen exprimiert (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011).

Im ZNS hingegen konnte eine Einwanderung von T Zellen anhand des Anstiegs der CD3 ϵ Expression an d14 im Rückenmark beobachtet werden. Diese zeigte einen biphasischen Verlauf an d14 und d21 der Effektorphase. Ein ähnlicher Verlauf der Expression konnte ebenfalls bei der FoxP3 und T-bet Expression nachgewiesen werden. Die proinflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-17a und GM-CSF zeigten einen Expressionshöhepunkt an d14, wobei IL-17a auch an d17 hochgradig exprimiert wurde. Zusammenfassend wurde ein stark proinflammatorisches Milieu, vor allem im Rückenmark, ermittelt. Diese Daten korrelieren mit den Befunden, dass es nach Immunisierung in der Milz nur zu einer sehr geringen Expression, der für die EAE wichtigen Zytokine kommt. Die T_{eff} Zellen werden erst auf dem Weg ins ZNS aktiviert und üben erst hier ihre detrimentalen Funktion aus (Odoardi et al., 2012). Erst im ZNS konnte eine hohe Anzahl an IL-17 und IFN γ produzierenden Zellen mittels intrazellulärer Färbung detektiert werden (Korn et al., 2007).

Diese Arbeit konnte zum ersten Mal die für die IFN β Produktion verantwortliche Zellpopulation als residente Mikroglia identifizieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die residenten Mikroglia auch am Höhepunkt der Erkrankung mittels definierter PAMPs zu einer IFN β Produktion anregen lassen, was für eine mögliche Therapie mit TLR-Agonisten von großer Relevanz sein könnte (Gambuzza et al., 2011). Die Umgebung, in der eine IFN β Expression während der EAE stattfand war proinflammatorisch und war vor allem im Rückenmark präsent.

3.1.3 Charakterisierung der IFN β /YFP im ZNS nach Stimulation mit definierten PAMPs *in vitro* und *in vivo*

Die Identifizierung residenter Mikroglia als Hauptproduzenten von IFN β /YFP während der EAE führte zu der Frage, ob Mikroglia *ex vivo* und *in vivo* auch nach der Stimulation mit definierten PAMPs in der Lage sind, IFN β /YFP zu produzieren. Für neonatale Mikroglia-Kulturen konnte dies bereits auf mRNA Ebene nach poly:I:C Stimulation gezeigt werden (Town et al., 2006). Weitere Publikationen konnten zeigen, dass neonatale Mikroglia im Basalzustand die TLRs 1-9 exprimieren und nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs oder dem Theilers murine encephalomyelitis virus die Expression weiter heraufregulieren. Deren Stimulation mit verschiedenen TLR Agonisten führte zu spezifischen Antworten bezüglich der Expression von Zytokinen und Chemokinen (Olson and Miller, 2004). In einem Stimulationsversuch sollte die Antwort intrazerebraler Leukozyten auf eine *ex vivo* Stimulation

mit polyI:C und LPS untersucht werden (Abb. 2.11). PolyI:C induzierte eine IFN β Expression, so wie auch die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-6 und IL-12p40. *In vivo* führte die Gabe von polyI:C zu einer Mikrogliose (Town et al., 2006). Eine nähere *in vivo* Beschreibung steht noch aus. Für LPS konnte ein ähnliches Zytokinprofil gezeigt werden. Seine Wirkung konnte *in vivo* jedoch näher beschrieben werden. So induzierte LPS eine Aktivierung von Mikroglia, die sowohl zu einer Neurodegeneration als auch zum induzierten Zelltod von Oligodendrozyten führte (Lehnardt et al., 2002; Lehnardt et al., 2003).

Die *ex vivo* Stimulation intrazerebraler Leukozyten mit polyI:C und LPS sollte in diesem Kontext zeigen, welche Zellpopulationen auf diese Stimuli mit einer IFN β /YFP Expression antworten. Erneut wiesen Mikroglia eine IFN β /YFP Expression auf, wie in dieser Arbeit auch schon während der EAE gezeigt werden konnte. Damit konnte nun auch auf Einzelzellebene gezeigt werden, dass Mikroglia auch nach Stimulation mit definierten PAMPs IFN β /YFP. Um die *ex vivo* Beobachtungen zu erweitern, wurde das virale Analogon polyI:C als bisher stärkster Induktor von IFN β /YFP intraventrikulär injiziert. Dies diente zur Nachahmung einer zerebralen Virusinfektion mit einem RNS Virus, wie z.B. mit dem West-Nile Virus. Die FACS-Analyse zeigte erneut Mikroglia als die Produzenten des IFN β /YFP (Abb. 2.12). Dies konnte mittels Immunhistochemie bestätigt werden (Abb. 2.13). IFN β /YFP produzierende Zellen befanden sich im paraventrikulären Gewebe des vierten Ventrikels und zeigten eine rundlich bis ovale Morphologie partiell mit dendritischen Ausläufern, wie sie für aktivierte Mikroglia typisch ist. Da IFN β als Initiator-Zytokin gilt und als eines der ersten Zytokine nach einer Stimulation exprimiert wird, könnten Mikroglia als Zellen des angeborenen Immunsystems *in vivo* eine wichtige Rolle spielen und wären durch die Expression von IFN β die Initiatoren einer antiviralen Immunantwort. Dieses Ergebnis würde dem Befund widersprechen, dass Neuronen nach einer Stimulation mit den neurotrophen ssRNS Viren Theiler's murine encephalomyelitis virus oder dem La Crosse Virus zur IFN β Expression angeregt werden und einen erheblichen Anteil zur Typ I IFN Antwort beisteuern. Dies konnte jedoch nur mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte die Expression von IFN α mit Hilfe der Immunhistochemie in infizierten Neuronen gezeigt werden. Weitere Zelltypen, die als IFN-Produzenten identifiziert wurden, waren M Φ und Ependymzellen (Delhaye et al., 2006). Dieses Infektionsmodell mit neurotrophen Viren ist jedoch nicht vollständig mit dem hier verwendeten Modell der definierten PAMP Stimulation vergleichbar. Die Viren besitzen einen natürlichen neuronalen Tropismus, während TLR3 und MDA5 im ZNS durch verschiedene Zelltypen exprimiert werden. Somit kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass Neuronen in anderen Modellen auch Typ I IFN exprimieren. Dies konnte z.B. für humane postmitotische Neuronen gezeigt werden. Sie exprimierten IFN β mRNS nach einer Stimulation mit dem ssRNS Rabiesvirus und mit polyI:C (Prehaud et al., 2005). Somit scheinen Neurone grundsätzlich in der Lage zu sein Typ I IFN zu exprimieren. Die Isolation intrazerebraler Leukozyten mittels Percoll-Gradient schließt Neurone von der Analyse aus, da diese meist zusammen mit dem Myelin verworfen werden, so dass hier eine Analyselücke besteht. Die Vermutung, dass Mikroglia nach polyI:C Stimulation die Hauptproduzenten des IFN β /YFP sind, wurde durch die immunhistochemische Färbung (Abb. 2.13) bestärkt, da hier nur Mikroglia-ähnliche Zellen ein positives Signal für YFP zeigten. Um diese Annahme zu bestätigen sollte in Zukunft die Fähigkeit von Neuronen zur IFN β /YFP Produktion überprüft werden. Für die genauere und funktionelle Charakterisierung IFN β /YFP produzierender Mikroglia konnte in Anlehnung an Ponomarev *et al.*, eine *in vitro* Mikroglia-Kultur aus

adulten Tieren etabliert werden (Abb. 2.14)(Ponomarev et al., 2005). Diese ermöglichte zum ersten Mal die Kultivierung adulter Mikroglia im Ruhezustand, mit einer niedrigen Expression von CD86 und MHC Klasse II. Die so generierten Zellen waren in der Lage nach Stimulation durch die Heraufregulation von MHC Klasse II T Zell-Proliferation zu induzieren. Außerdem konnte diese Kultur über Wochen aufrechterhalten werden. Bisher werden vor allem neonatale Tiere für die Generierung von *in vitro* Mikroglia-Kulturen genutzt. Diese weisen jedoch erhebliche Unterschiede zu Kulturen aus adulten Tieren auf. So wies neonatale Mikroglia *in vitro* nur eine amöboide Morphologie auf und war partiell aktiviert, wie durch die intermediäre Expression von MHC Klasse II und kostimulatorischen Markern gezeigt wurde (Aloisi et al., 1999; Carson et al., 1998; De Groot et al., 1991). Die in dieser Arbeit kultivierte Mikroglia aus dem adulten Tier wies die Kapazität zur Proliferation in der Abwesenheit einer CD86 Expression auf. So konnte diese Kultur ebenfalls über mehrere Wochen aufrechterhalten werden. Die optimale Stimulierbarkeit war nach 14 Tagen *in vitro* Kultur erreicht, da hier das höchste IFN β /YFP Signal ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich ließen sich die Zellen mittels verschiedener PAMPs (polyI:C, CpG und wobble DNS) zur IFN β /YFP Expression stimulieren. Somit konnte ein *in vitro* Modell für adulte Mikroglia etabliert werden, die wie auch *in vivo* IFN β /YFP exprimieren und in weiteren Arbeiten als Grundlage für eine phänotypische als auch funktionelle Charakterisierung der IFN β /YFP⁺ versus IFN β /YFP⁻ Mikroglia dienen soll, da sich neonatale Mikroglia evtl. in ihrer Responsivität auf Stimulation unterscheiden.

Durch die Identifizierung von Mikroglia als IFN β /YFP produzierende Zellen können diese eine protektive IFN β Antwort im Verlauf der EAE vermitteln und immunmodulatorisch im Kontext von Infektionskrankheiten wirken. Durch das ständige patrouillieren des ZNS agieren sie per se als Wächterzellen und detektieren Abnormalitäten in kürzester Zeit, was zu ihrer Aktivierung beiträgt. Diese Funktion wird durch die Induktion des Initiatorzytokins IFN β unterstrichen.

Ihre Fähigkeit zur Migration ermöglicht es den Mikroglia schnell zum Fokus der ablaufenden Immunreaktion zu gelangen. Hier tragen sie unter anderem zur Rekrutierung weiterer Effektorzellen bei. Das sekretierte IFN β ermöglicht zusätzlich die parakrine Modulation attraktierter Zellen. Im Kontext der EAE spielt die IFN β vermittelte Inhibition von M Φ eine wichtige Rolle. Kommt es jedoch zu einer Infektion des ZNS könnten diese Fähigkeiten zu einer schnellen Initiation einer Immunantwort führen, was vor allem im ZNS von großer Bedeutung ist, da aufgrund seiner geringen Regenerationsfähigkeit, selbst kleine Schäden große funktionelle Auswirkungen haben können. Im Fall von Infektionen mit einem neurotrophen Virus könnte der antivirale Status in Neuronen induziert werden und ein Fortschreiten der Infektion inhibieren. Die Vermutung, dass Mikroglia zur IFN β Produktion befähigt sind, liegt nahe, da sie als die M Φ des ZNS bezeichnet werden und diese auch IFN β produzieren können.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass residente Mikroglia sowohl während der EAE als auch nach Stimulation mit definierten PAMPs IFN β /YFP produzierten. Mit Hilfe des bicistronischen Knock-in Reporter-Mausmodells für IFN β /YFP konnte dies zum ersten Mal auf Einzelzellebene gezeigt werden. Somit leisten Mikroglia als Initiatoren und Regulatoren einen wichtigen Beitrag zur Induktion und Modulation der Immunantworten im ZNS.

3.2 Untersuchung der IFN β Expression in der Polymikrobiellen Peritonitis und seiner Bedeutung in der Polymikrobiellen Peritonitis im Kontext einer viralen Infektion

Trotz aller medizinischen Fortschritte bleiben intraabdominale Infektionen wie die polymikrobielle Peritonitis und die darauffolgende Sepsis mit einer hohen Mortalitätsrate assoziiert. Beim Menschen wird die polymikrobielle Peritonitis z.B. durch eine Insuffizienz von Anastomosen colorektaler Operationen hervorgerufen. Die CASP stellt ein Modell dar, welches die Möglichkeit bietet, eine analoge Situation im Tiermodell herzustellen und schließlich eine Sepsis zu induzieren.

Im Bezug auf die Pathogenese der Sepsis herrscht das Konzept vor, dass es anfangs zu einer starken proinflammatorischen und oft überschießenden Immunreaktion kommt (SIRS), die schließlich in einer Immunparalyse und einer defekten Immunantwort mündet (CARS). Klinische Studien konnten zeigen, dass es zu einer anhaltenden Verminderung der Expression wichtiger Zytokine, z.B. IL-12, IL-1 β und IL-10 kommt (Weighardt et al., 2000b). Die daraus resultierende eingeschränkte Funktionalität des Immunsystems trägt außerdem zu einem verminderten Langzeit-Überleben von Sepsispatienten bei (Quartin et al., 1997). In den letzten Jahren konnten nur wenige der Mechanismen identifiziert werden, die zu einer Dysregulation der Immunantwort in der Sepsis führen. So scheint die Regulation der Zytokinexpression eine wichtige Rolle zu spielen. Immunsupprimierende Effekte in DCs aus post-septischen Mäusen äußerten sich in einer vorübergehenden DC-Depletion im Knochenmark. Nach ihrer Rekonstitution produzierten sie jedoch erhöhte Mengen von IL-10 und unterdrückten T_H1 Immunantworten. Viele Studien konnten zeigen, dass vor allem eine akute virale Infektion, die zu einer hohen Typ I IFN Produktion führt, zu einer detrimentellen Hypersensitivität gegenüber einer Sepsis beiträgt (Beadling and Slifka, 2004). Bisherige Publikationen untersuchten jedoch nur das Typ I IFN System als Ganzes, so dass der Beitrag, den IFN β dabei leistet, ungeklärt blieb.

Ziel dieser Arbeit war es daher die Beteiligung von IFN β als sogenanntem Initiatorinterferon, in einer IFN-vermittelten Hypersensitivität gegenüber einer polymikrobiellen Sepsis zu untersuchen. Dazu wurde eine Typ I IFN Antwort mittels polyI:C Stimulation induziert, so dass eine akute Virusinfektion simuliert wurde. Weiterhin sollte die Quelle der IFN β -Produktion identifiziert und seine Expression näher charakterisiert werden.

3.2.1 Relevanz der IFN β -Expression für eine Interferon-induzierte Hypersensitivität gegenüber einer Polymikrobiellen Peritonitis

Typ I IFN vermittelt nicht nur eine antivirale Immunität, sondern wird auch im Verlauf von bakteriellen Infektionen induziert (Biron, 1998; Bogdan et al., 2004). Während nicht-viralen Infektionen kann es sowohl vorteilhafte, als auch nachteilige Effekte vermitteln.

Im Fall einer bakteriellen Sepsis vermittelt Typ I IFN einen detrimentalen Effekt. Viele Publikationen, die die Auswirkungen einer viralen Infektion auf den Verlauf der Sepsis untersuchten, konnten zeigen, dass Typ I IFN induziert wurde und sich nachteilig auswirkte (Doughty et al., 2006; Nansen and Randrup Thomsen, 2001; Tian et al., 2012). Es kam zu kürzeren Überlebenszeiten, einer erhöhten bakteriellen Last und einer höheren Expression proinflammatorischer Zytokine. Diese Daten wurden vor allem im Modell der CLP erhoben, in dem es zu einer sich langsam entwickelnden Sepsis oder Abszessbildung kommt (Maier et al., 2004). Die mittels CLP generierten Ergebnisse sind jedoch nicht in allen Fällen auf die CASP übertragbar. Im CASP-Modell konnte die detrimentalen Wirkung von Typ I IFN auf den Verlauf der CASP jedoch bestätigt werden. So wurde gezeigt, dass IFNARI^{-/-} Mäuse in einer Überlebenskinetik ein signifikant höheres Überleben gegenüber wt Mäusen aufwiesen (Weighardt et al., 2006). Im Modell des LPS-Schocks konnte zusätzlich gezeigt werden, dass IFN β und andere Typ I IFNs für die Vermittlung des TNF α -vermittelten lethalen Schocks essentiell sind. Paradoxaerweise konnte dem Typ I IFN in der CLP aber auch ein protektiver Effekt zugeschrieben werden. Hier zeigten IFNARI^{-/-} Mäuse einen Nachteil im Überleben gegenüber wt Mäusen. So wiesen die IFNARI^{-/-} Mäuse einen Defekt in der Granulozytenrekretierung aufgrund einer fehlenden CXCL-10 Expression auf (Kelly-Scumpia et al., 2010). All diese Veröffentlichungen vernachlässigen jedoch die Bestimmung des Einflusses von IFN β , welches neben IFN α_4 als erstes Mitglied der Typ I IFN Familie exprimiert wird.

Zur Erweiterung des bisherigen Kenntnisstandes über den Einfluss von IFN β in der CASP, wurde die Rolle, die virus-induziertes IFN β während der polymikrobiellen Sepsis spielt, zunächst in einer Überlebenskinetik untersucht. Hierzu wurden C57Bl/6 wt, IFN β ^{-/-} und IFNARI^{-/-} Mäuse in der Länge ihrer Überlebenszeit verglichen. IFN β ^{-/-} Mäuse zeigten, verglichen mit wt und IFNARI^{-/-} Mäusen, im unstimulierten Zustand und nach 200 μ g polyI:C ein intermediäres Überleben. Auch nach 20 μ g polyI:C Stimulation konnte ein tendenziell längeres Überleben der IFN β ^{-/-} Mäuse gegenüber wt Mäusen gezeigt werden. Wt Mäuse wiesen die signifikant kürzeste und IFNARI^{-/-} Mäuse die signifikant längste Überlebenszeit auf (s. Abb. 2.15). Diese Ergebnisse konnten zeigen, dass IFN β bei der Vermittlung einer Typ I IFN vermittelten Dysregulation der Immunantwort gegenüber der CASP einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hat. Der vermittelte Effekt war gegenüber der Gesamtheit der Typ I IFNs jedoch nur gering, da auch alle IFN β ^{-/-} Mäuse nach ca. 42 h verstorben waren, während in jeder Gruppe IFNARI^{-/-} Mäuse überlebten. Somit ist IFN β in der Vermittlung einer detrimentalen Immundysregulation nach Virusinfektion weitgehend redundant und kann durch andere Typ I Interferone ersetzt werden. Interessanterweise zeigten IFN β ^{-/-} Mäuse unter allen Stimulationsbedingungen eine vergleichbare Überlebenszeit von 42 - 43 h, und die polyI:C Stimulation schien keinen Einfluss auf die Überlebenszeit zu haben. Im Gegensatz dazu führte die polyI:C Stimulation in wt Mäusen zu einer kürzeren Überlebenszeit im Vergleich zur naiven Situation. IFNARI^{-/-} Mäuse zeigten nach polyI:C Stimulation ein Überleben in 40 % (s. Abb. 2.15). Die gesteigerte

CASP Überlebensrate von IFNARI^{-/-} nach polyI:C Stimulation im Vergleich zu nicht vorstimulierten IFNARI^{-/-} ist möglicherweise durch die polyI:C vermittelte Induktion anderer protektiver Mediatoren zu erklären. Diese könnten in Abwesenheit des detrimental Typ I IFN die Tiere schützen, da dsRNS auch zu einer IFN unabhängigen Genexpression führt. Humane PBMCs, die nicht in der Lage waren Typ I IFN zu exprimieren, zeigten nach einer polyI:C Stimulation eine Induktion von 175 und eine Repression von 95 Genen. Die regulierten Gene gehörten dabei unterschiedlichen funktionellen Gruppen an. Diese waren RNS- und Proteinsynthese, Proteinprozessierung, Metabolismus, Transport und Zellstruktur (Geiss et al., 2001). Die Autoren treffen jedoch keine Aussage über das proinflammatorische Potenzial dieser Ergebnisse. Den in dieser Arbeit gewonnenen Daten zufolge ist es wahrscheinlich, dass es zu einer Repression oder geringeren Expression proinflammatorischer Mediatoren kommt, was das Immunsystem vor einer exzessiven Antwort schützt.

Des Weiteren wurde die bakterielle Last in allen Genotypen 12 h nach CASP-OP und nach CASP-OP mit polyI:C Vorstimulation (200 µg) verglichen, da diese meist mit der Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert. Für Typ I IFN war bisher bekannt, dass es zu einer Erhöhung der bakteriellen Last beiträgt (Nansen and Randrup Thomsen, 2001; Tian et al., 2012). Wt Mäuse zeigten im Gegensatz zu IFNβ^{-/-} Mäusen nach polyI:C Stimulation nur eine geringe, jedoch keine signifikante Erhöhung der bakteriellen Last in der Peritonealhöhle und der Milz, während IFNARI^{-/-} Mäuse keinen Einfluss der polyI:C Stimulation auf die bakterielle Last zeigten (s. Abb. 2.16). Diese Ergebnisse bestätigen ebenfalls die Annahme, dass IFNβ nur einen geringen Einfluss auf den Verlauf der CASP vermittelt und anderes Typ I IFN den entscheidenden, negativen Beitrag in der CASP vermittelt.

Die Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der Peritonealhöhle liefert in der Sepsis einen weiteren wichtigen Anhaltspunkt für die Effektivität der ablaufenden Immunantwort. Die zeitnahe Rekrutierung von Granulozyten stellt einen wichtigen Mechanismus zur Eliminierung von Pathogenen dar und spielt in bakteriell vermittelten intraabdominalen Infektionen eine protektive Rolle (Feterowski et al., 2001; Weighardt et al., 2000a). Granulozyten sind hierbei besonders in der frühen Phase der Immunantwort die wichtigsten Effektorzellen. Höhere Granulozytenzahlen korrelierten in IFNARI^{-/-} Mäusen mit einer geringeren bakteriellen Last und einem besseren Überleben. Bei der Rekrutierung von Granulozyten spielt Typ I IFN somit eine wichtige Rolle, da sowohl die endogene Typ I IFN Antwort, als auch die viral induzierte Typ I IFN Antwort nach CASP-OP zu einer reduzierten Rekrutierung von Granulozyten in die Peritonealhöhle und zu geringeren Granulozytenzahlen im Knochenmark führten (Navarini et al., 2006; Weighardt et al., 2006). Beide Studien zeigten, dass IFNARI^{-/-} Mäuse höhere Granulozytenzahlen am Ort des bakteriellen Fokus aufwiesen.

In dieser Arbeit konnte die Bestimmung der rekrutierten Granulozyten und die Bestimmung der MΦ in der Peritonealhöhle zeigen, dass IFNβ bei der Modulation der zellulären Komposition der Peritonealhöhle ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle spielte. Wt und IFNβ^{-/-} Mäuse zeigten nach polyI:C Stimulation und CASP die stärkste Inhibition der Granulozytenrekrutierung im Vergleich zur CASP allein. Im Gegensatz dazu zeigten IFNARI^{-/-} Mäuse eine Abnahme der Granulozyten nach polyI:C Vorstimulation, jedoch ohne signifikanten Unterschied (s. Abb. 2.17). Im Bezug auf MΦ konnte jedoch ein Effekt von IFNβ nachgewiesen werden. Nur wt Mäuse zeigten hierbei eine signifikante Abnahme der MΦ. Somit kam es in wt Mäusen zu einer stark verminderten Zahl von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Die Analyse der IFNβ^{-/-} Mäuse zeigte, dass IFNβ nur einen Einfluss auf die Anwesenheit von MΦ spielte, während IFNARI^{-/-} Mäuse die höchsten Zahlen an Effektorzellen

aufwiesen. Somit vermittelte IFN β , aber vor allem Typ I IFN, seine detrimental Wirkung u. a. durch eine Inhibition der Effektorzellrekrutierung und trug damit zu einer höheren Bakterienlast bei.

Dabei blieb die Abnahme der M Φ Zahlen in der Peritonealhöhle mechanistisch ungeklärt. Möglicherweise induzierten Typ I IFN oder IFN β in dieser Situation Apoptose in den M Φ oder es kam zu einer Emigration der M Φ aus der Peritonealhöhle. Die niedrige Anzahl von Granulozyten in wt Mäusen hingegen kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Apoptose zurückgeführt werden, da LCMV induziertes Typ I IFN während einer *Listeria monocytogenes* Infektion zur Apoptose von Granulozyten im Knochenmark führt und mit niedrigeren Zellzahlen in Leber und Blut assoziiert ist (Navarini et al., 2006). Für das Virus liefert die Depletion von Granulozyten den Vorteil, in dem diese zu einem späteren Zeitpunkt zu einer geringeren adaptiven Immunantwort beiträgt, da Granulozyten eine Quelle für T Zell-rekrutierende Chemokine darstellen (Molesworth-Kenyon et al., 2005; Slifka et al., 2003). Weiterhin leiden Patienten während Typ I IFN Therapien z.B. bei Hepatitis B und C, unter einer Granulozytopenie und weisen ein höheres Risiko von bakteriellen Superinfektionen auf (Puoti et al., 2004).

Die Induktion einer polymikrobiellen Peritonitis führt außerdem zu einer schnellen Induktion vieler Zytokine, die einen wichtigen Beitrag zur Klärung der Infektion leisten. Daher wurde zur weiteren Charakterisierung der Immunantwort der drei Genotypen die Bestimmung essentieller Zytokine während der CASP durchgeführt. IL-12p40 wurde als für das Überleben der CASP essentielles Gen beschrieben (Entleutner et al., 2006). Es induziert u. a. die IFN γ Produktion in NK-Zellen, was zu einer Aktivierung wichtiger Effektormechanismen beiträgt. Zusätzlich wurde die TNF α und die IL-10 Produktion in der Peritonealhöhle bestimmt. TNF α ist als proinflammatorisches Zytokin für die Aktivierung wichtiger Effektormechanismen, wie z.B. der Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies, und der Induktion weiterer Effektormoleküle von großer Bedeutung. Bei einer exzessiven TNF α Produktion kann dies jedoch zu einer Immunpathologie und zum Typ I IFN abhängigen, TNF α -vermittelten lethalen Schock führen. IL-10 übt dagegen viele antiinflammatorische Wirkungen aus und wirkt einer Immunpathologie entgegen. Im Kontext der CASP konnte jedoch gezeigt werden, dass die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren nicht beeinflusst wird und durch alternative, jedoch ungeklärte Mechanismen protektiv wirkt (Emmanuilidis et al., 2001). Eine mögliche Erklärung besteht in einer verminderten IFN γ Produktion in der Milz, wodurch es möglicherweise zu einer suboptimalen Aktivierung bestimmter Effektorzellen bzw. Effektormechanismen kommt.

Die IL-12p40 Produktion wurde sowohl im Serum als auch in der Peritonealhöhle bestimmt und war vergleichbar, wobei in der Peritonealhöhle niedrigere Werte gemessen wurden (s. Abb. 2.18). Wt Mäuse zeigten die höchste Produktion von IL-12p40 im Vergleich zu IFN $\beta^{-/-}$ und IFNARI $^{-/-}$ Mäusen. Weiterhin wiesen sie auch den signifikantesten Anstieg der IL-12p40 Konzentration zwischen CASP und CASP mit polyI:C Vorstimulation auf. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass IL-12p40 durch IFN β und in einem stärkeren Maß durch Typ I IFN reguliert wird, da IFN $\beta^{-/-}$ und IFNARI $^{-/-}$ Mäuse geringere Werte von IL-12p40 aufwiesen. Durch seine Funktion als Induktor der IFN γ Expression könnte es in diesem Kontext als Teil der überschießenden proinflammatorischen Antwort detrimental wirken und zu einer Immunpathologie beitragen.

Die Analyse der IFN β Produktion im Serum zeigte, dass die CASP gegenüber der alleinigen polyI:C Stimulation zu einer starken Induktion führte und die polyI:C Vorstimulation zwar zu einer Erhöhung

der IFN β Produktion beitrug, die jedoch nicht signifikant war. Dies zeigte, dass IFN β auch als Protein vorliegt und an der Immunantwort beteiligt ist. Frühere Publikationen konnten eine IFN β Expression während der Sepsis nur auf RNS Ebene nachweisen oder detektierten Typ I IFN im Bioassay (Weighardt et al., 2006). Die Analyse der TNF α Produktion in der Peritonealhöhle zeigte ein vergleichbares Profil wie IL-12p40. Wt Mäuse wiesen die höchsten Proteinkonzentrationen auf, gefolgt von IFN $\beta^{-/-}$ Mäusen. IFNARI $^{-/-}$ Mäuse zeigten dagegen keine signifikante Änderung zwischen CASP und CASP mit polyI:C Vorstimulation. Somit wiesen IFNARI $^{-/-}$ Mäuse in dieser Hinsicht nur eine gering pro-inflammatorische Immunantwort auf. In der IL-10 Produktion zeigte keiner der Genotypen signifikante Unterschiede zwischen CASP und polyI:C CASP auf. Für IFN $\beta^{-/-}$ und IFNARI $^{-/-}$ Mäuse wurden jedoch höhere Werte für IL-10 ermittelt, was möglicherweise einen protektiven Effekt vermittelte.

Im Bezug auf den Vergleich der Zytokinproduktion der drei Genotypen konnte gezeigt werden, dass IFN β nur einen geringen Einfluss auf die Expression der hier getesteten Zytokine ausübte. Wt Mäuse zeigten ein hoch proinflammatorisches Zytokinprofil, während IFNARI $^{-/-}$ Mäuse nur über eine schwache Expression proinflammatorischer Zytokine verfügten. IFN $\beta^{-/-}$ Mäuse zeigten eine intermediäre Antwort auf. Somit führen IFN β , aber vor allem Typ I IFN zu einer Potenzierung der proinflammatorischen Zytokinproduktion und wirken sich negativ auf den Verlauf der CASP aus. Die durch die polyI:C induzierte Typ I IFN Antwort zeigte in der Verbindung mit der CASP eine synergistische Erhöhung von IL-12p40 und TNF α , die sich in diesem Kontext detrimentell auswirkte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IFN β in der frühen Phase der Immunantwort der CASP nur eine schwach modulierende Wirkung aufweist. Seine Abwesenheit führte zu einer geringen Verlängerung der Überlebenszeit, wirkte sich aber kaum auf die Rekrutierung von Effektorzellen und das bei der CASP vorherrschende proinflammatorische Zytokinprofil aus. Somit besitzt IFN β in der CASP weitestgehend eine redundante Funktion.

3.2.2 Charakterisierung der IFN β und IL-12p40 produzierenden Zellen in der CASP

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die IFN β /YFP Produzenten in der CASP auf Einzelzellebene darzustellen, diese zu charakterisieren und den möglichen Einfluss einer Virusinfektion auf das zelluläre Expressionsmuster zu untersuchen. Wie bereits dargestellt, spielt jedoch IL-12p40 ebenfalls eine wichtige Rolle in der CASP. Mehrere Studien konnten eine Modulation der IL-12p40 Expression durch IFN β bzw. Typ I IFN zeigen. So führt eine virale Infektion zu einer IFN β bzw. Typ I IFN vermittelten Inhibition der IL-12p40 Expression (Cousens et al., 1997; Cousens et al., 1999; Dalod et al., 2002). Im Gegensatz dazu ist Typ I IFN nach TLR Stimulation für eine optimale IL-12p70 Expression notwendig (Gautier et al., 2005). Unter zu Hilfenahme des IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} Doppel-Reportermausmodells wurden die Auswirkungen einer Virus-induzierten IFN β bzw. Typ I IFN Antwort auf die IL-12p40/GFP Expression während der CASP auf Einzelzellebene untersucht.

Wie oben dargestellt zeigten IFN $\beta^{-/-}$ und vor allem IFNARI $^{-/-}$ Mäuse eine verringerte IL-12p40 Produktion (s. Abb. 2.18). Somit trägt Typ I IFN im Modell der CASP und nach einer polyI:C Vorstimulation zu einer verstärkten Produktion von IL-12p40 bei. Um den Einfluss einer Virusinfektion auch auf Einzelzellebene zu untersuchen, wurde die simultane IFN β /YFP und IL-

IL-12p40/GFP Expression in IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} Mäusen zunächst im naiven Zustand, in der CASP und polyI:C CASP untersucht und quantifiziert.

Im naiven Zustand konnte in der Milz nur eine IL-12p40/GFP Expression detektiert werden, da IFN β /YFP nur unter optimalen Stimulationsbedingungen exprimiert wird (s. Abb. 2.20). Sowohl in der Peritoneallavage, als auch in der Milz konnte eine höhere Anzahl IL-12p40/GFP⁺ Zellen in der CASP mit einer polyI:C Vorstimulation nachgewiesen werden, wobei alle IL-12p40/GFP produzierenden Zellen als cDCs identifiziert wurden (s. Abb. 2.20 - 2.23). Somit induzierte die polyI:C Stimulation nicht nur eine höhere Produktion von IL-12p40 während der CASP, wie bereits beschrieben (s. Abb. 2.18), sondern auch eine IL-12p40/GFP Expression in einer höheren Zellfrequenz. Der Vergleich der IL-12p40 Produzenten im naiven Zustand und der IL-12p40 Produzenten nach CASP zeigt, dass es im Gegensatz zur basalen Expression nicht zu einer vorwiegenden Expression von IL-12p40/GFP in CD11b⁻, CD8 α ⁺ cDCs kam, sondern die IL-12p40/GFP Expression vor allem in CD11b⁺, CD8 α ⁻ cDCs induziert wurde. Somit wurde die IL-12p40/GFP Expression vor allem in einer vorher IL-12p40/GFP⁻ cDC Population induziert. Dies geht mit zuvor publizierten Daten einher. Initial wurden nach bakterieller Stimulation vor allem CD11b⁻, CD8 α ⁺ cDCs als IL-12p40 Produzenten beschrieben (Reis e Sousa et al., 1999). Dieses Konzept konnte erweitert werden, da gezeigt wurde, dass es in Abhängigkeit vom Stimulus zu einer IL-12p40 Expression in unterschiedlichen cDC Subpopulationen kommt. So können unterschiedliche cDC Populationen alternative PAMPS erkennen, so dass es zu einer spezifischen Aktivierung unterschiedlicher T Zell Antworten kommen kann (Huang et al., 2001). Eine simultane IFN β /YFP Expression konnte nur in der Milz während der CASP nachgewiesen werden (s. Abb. 2.22). IFN β /YFP Produzenten waren vor allem CD11b⁻, CD8 α ⁺ cDCs und zeigten eine weitaus geringere Frequenz als IL-12p40/GFP Produzenten. Die polyI:C Vorstimulation trug zusätzlich zur CASP alleine zu einer höheren Anzahl IFN β /YFP⁺ Zellen bei (s. Abb. 2.23a).

Die weitere Analyse der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten konnte zeigen, dass beide Reporterallele vor allem exklusiv exprimiert wurden und nur wenige Zellen beide Reporterallele gleichzeitig exprimierten (s. Abb. 2.22b). Damit wurde hier zum ersten Mal die gleichzeitige Expression beider Zytokine auf Einzelzellebene gezeigt. IL-12p40/GFP und IFN β /YFP produzierende Zellen waren wie die IFN β /YFP⁺ cDCs CD11b⁻ und CD8 α ⁺.

Die Quantifizierung der Reporterallel exprimierenden Zellen in der CASP identifizierte die Milz als Hauptproduktionsort von IL-12p40/GFP und IFN β /YFP. Hier konnte die höchste Frequenz der Reporterallel exprimierenden Zellen vorgefunden werden. Die polyI:C Vorstimulation führte zu einer IL-12p40/GFP Expression in einer gering höheren Anzahl von Zellen als nach CASP alleine. Wird dies mit der IL-12p40 Produktion verglichen, schien vor allem die Zytokinproduktion pro Zelle durch die polyI:C Vorstimulation erhöht zu werden (s. Abb. 2.18). Der Haupteffekt auf die Frequenz der Reporterallel-Expression konnte in der IFN β /YFP Expression beobachtet werden, da hier nach polyI:C Vorstimulation doppelt so viele positive Zellen detektiert wurden. Der hohe Anstieg der Anzahl der IFN β /YFP Produzenten war vor allem auf den Anstieg der Frequenz der Zellen zurückzuführen, die eine simultane Expression beider Reporterallele aufwiesen (s. Abb. 2.23a). Die IFN β Produktion im Serum wies analog zur Frequenz der IFN β /YFP Produzenten ebenfalls einen Anstieg nach CASP-OP mit polyI:C Vorstimulation auf (s. Abb. 2.18a).

In der Peritonealhöhle konnten dagegen nur wenige IL-12p40 produzierende Zellen detektiert werden (s. Abb. 2.23b). Dies beruhte unter anderem auf der geringen Anwesenheit von DCs in der

Peritonealhöhle, da im naiven Zustand MΦ den größten Teil der anwesenden Zellen ausmachen, gefolgt von B Zellen. Im Verlauf der CASP kommt es generell zu einer hohen Granulozyteninfiltration, so dass DCs nur eine kleine Population darstellen. Weiterhin herrscht hier ein anderes Milieu im Bezug auf lokale Mediatoren vor, die die Zytokinexpression beeinflussen könnten. Die Produktion von IL-12p40 und IFNβ in der Milz hat gegenüber der Peritonealhöhle für die Induktion einer optimalen Immunantwort den Vorteil, dass sie eine sehr hohe Dichte an Immunzellen besitzt. Diese können durch ihre Nähe zu den Reporterallel-Produzenten im Lauf einer Immunreaktion schnell und effizient aktiviert werden. Ein weiterer Punkt, der für die Milz als Vermittler einer Immunantwort spricht, ist die sehr gute Anbindung an die Blutzirkulation, sodass die produzierten Faktoren und wichtige Effektorzellen die Milz schnell verlassen können. Andererseits bietet sie im Verlauf der CASP den Nachteil, dass es erst nach einer systemischen Streuung und damit zu einer verzögerten Zytokinantwort kommen kann. Dies ist möglicherweise der Grund, weshalb eine IFNβ/YFP Expression 12 h nach CASP-OP nicht detektiert werden konnte. Ein weiterer Faktor, der eine zeitnahe IFNβ/YFP Detektion verzögert, ist die Zeit, die das YFP braucht, um seine endgültige Konformation anzunehmen und Fluoreszenz emittieren kann. Dieser Prozess kann bis zu 2 – 4 h in Anspruch nehmen (Heim et al., 1994; Nagai et al., 2002). Somit war die Detektion verglichen mit der Sekretion der Proteine zeitlich verzögert. Durch die relativ lange Halbwertszeit von GFP und YFP in der Zelle, kann außerdem keine exakte Aussage getroffen werden, wie viele Zellen zu einem gegebenen Zeitpunkt das jeweilige Zytokin produzieren, da dieses in den Zellen akkumuliert und verzögert degradiert wird.

Zur näheren Beschreibung der IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP Expression und der produzierenden Zellen, wurde die Reporterallel-Expression auch nach polyI:C und CpG2216 Stimulation bestimmt. Das TLR Expressionsprofil in verschiedenen DC Subpopulationen und die Interaktion mit spezifischen pathogen-abstammenden Liganden reguliert dabei die Aktivierung und Zytokinproduktion, wodurch es eine entsprechende Immunantwort maßgeblich beeinflusst (Boonstra et al., 2003). So weisen murine pDCs vor allem die endosomalen TLRs 7 und 9 auf, während cDCs TLR 2, 3, 4, 5 und in geringerem Maß TLR9 aufweisen (Barchet et al., 2005; Lund et al., 2003; Lund et al., 2004; Morrison, 2004). Zusätzlich exprimieren cDCs die zytoplasmatischen Helikasen RIG-I und MDA5, die ebenfalls zur Induktion von Typ I IFN beitragen.

Nach der TLR3/MDA5 Stimulation mittels polyI:C produzierten CD11b⁻/CD8α⁺ und CD11b⁺/CD8α⁻ cDCs IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP wurde hauptsächlich von CD11b⁻/CD8α⁺ cDCs produziert. Erneut zeigte sich eine nahezu exklusive Expression beider Reporterallele, mit nur wenigen IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP simultan exprimierenden Zellen (s. Abb. 2.24).

Nach CpG2216 Stimulation kam es, vergleichbar zur polyI:C Stimulation, in cDCs zu einer IL-12p40/GFP Expression. Die IFNβ/YFP exprimierenden Zellen wurden aufgrund des Oberflächenmarkerprofils als pDCs identifiziert (CD11c^{int}, CD11b⁻, CD8α⁺, B220⁺ (s. Abb. 2.26)). Auch nach CpG2216 Stimulation konnten nur wenige IL-12p40/GFP und IFNβ/YFP simultan exprimierende Zellen detektiert werden, die pDCs darstellten. Somit wurden beide Zytokine unter verschiedenen Stimulationsbedingungen nur von einem kleinen Anteil von CD11c⁺ Zellen einer bestimmten Subpopulation exprimiert. Die Stimulation mit den unterschiedlichen TLR Liganden führte zusätzlich zu einer unterschiedlich hohen Induktion der Zytokine in den jeweiligen Zellpopulationen. CpG2216 stellte sich dabei als stärkster IL-12p40 Induktor heraus und wies die höchste Anzahl simultan

exprimierender Zellen auf. Dies ist sinnvoll, da unmethylierte CpG Motive in hohen Konzentrationen sowohl in Bakterien, als auch in DNS-Viren vorkommen und IL-12 in der Abwehr beider Pathogenklassen wichtige Funktionen übernimmt (Cousens et al., 1999; Hsieh et al., 1993). Durch den MyD88 abhängigen Signalweg kommt es weiterhin zu einer höheren Aktivierung von Faktoren, die zu einer NF- κ B Aktivierung und damit einer proinflammatorischen Immunantwort führen. Im Gegensatz dazu erwies sich polyI:C als ein schwacher IL-12p40 Induktor, da es hauptsächlich Signalwege aktiviert, die zu einer Typ I IFN Expression führen. Dies und eine IRF3 vermittelte Inhibition der IL-12p40 Expression tragen zu einer niedrigeren IL-12p40 Expression bei (Negishi et al., 2012). Interessanterweise induzierten beide PAMPs IFN β /YFP in einer vergleichbaren Anzahl von Zellen, somit bestätigt dies die Annahme, dass selbst unter optimalen Stimulationsbedingungen nur ein bestimmter Anteil von Zellen in der Lage ist IFN β zu exprimieren.

Die immunhistochemische Analyse der IL-12p40/GFP⁺ und IFN β /YFP⁺ Zellen konnte Unterschiede in der Lokalisation von IFN β /YFP Produzenten nach PRR Stimulation zeigen, sodass sie möglicherweise unterschiedliche Aufgaben ausüben. Durch die Lokalisation der IL-12p40/GFP⁺ Zellen in den T Zell Arealen der weißen Pulpa könnten diese an der Induktion von T und NK Zell Antworten beteiligt sein, da IL-12 ein wichtiges Zytokin zur T_H1 Polarisierung darstellt (Gregoire et al., 2007; Manetti et al., 1993). IL-12p40/GFP exprimierende Zellen waren auch nach LPS Stimulation im Paracortex und den T Zell Arealen der Lymphknoten lokalisiert. Dabei akkumulierte das IL-12p40 Protein an Matrixproteinen von Venen mit hohem Endothel, welches die Eintrittspforte für T Zellen in den Lymphknoten darstellt. So würde eine optimale Interaktion zwischen dem löslichen Mediator und der T Zelle gewährleistet werden. Die IL-12p40/GFP⁺ Zellen weisen weiterhin *in vivo* wie auch *in vitro* eine höhere T Zell-stimulatorische Kapazität als IL-12p40/GFP⁻ Zellen der gleichen DC Subpopulation auf (Reinhardt et al., 2006). Die IFN β /YFP⁺ pDCs waren nach CpG2216 Stimulation vergleichbar lokalisiert. pDCs sind unter basalen Bedingungen in der weißen und roten Pulpa verstreut. In Abhängigkeit von Typ I IFN migrieren sie, CCR7-abhängig, vor allem in die Marginalzone und nur wenige pDCs können in den T Zell Arealen lokalisiert werden (Asselin-Paturel et al., 2005). Somit stellten die IFN β /YFP⁺ pDCs nach CpG2216 Stimulation eine spezialisierte pDC Population dar, die sich schon z.B. durch Ihre IFN β Expression von IFN β ⁻ pDCs und anderen DC Populationen unterschied. Im Gegensatz dazu waren polyI:C stimulierte IFN β /YFP⁺ cDCs in der Marginalzone angehäuft. cDCs sind im naiven Zustand vor allem in der roten Pulpa verstreut und migrieren nach Stimulation zur Marginalzone. Diese bildet eine wichtige Eintrittspforte für Antigene aus der Blutzirkulation. Sie werden durch die hier ansässigen M Φ Populationen, aber auch von B Zellen und DCs aufgenommen. Dies erlaubt einerseits deren Elimination mittels Phagozytose, Aktivierung durch Erkennung von Fremdartigen und die Präsentation an passierende T Zellen. Möglicherweise agieren die hier lokalisierten IFN β /YFP⁺ cDCs als eine Art Frühwarnsystem von Antigenen im Blutgefäßsystem und initiieren so eine entsprechende Immunantwort.

3.2.3 *In vitro* Charakterisierung der IFN β /YFP und IL-12p40/GFP Expression

cDCs waren nach polyI:C und CASP-OP die Hauptproduzenten von IFN β /YFP und IL-12p40/GFP. Dies ist mit bisher publizierten Daten vereinbar. Zur genaueren Analyse der Reporterallel-Expression und des Expressionsprofils wurden GM-CSF DCs mit TLR-Liganden stimuliert (s. Abb. 2.29). Die *in vitro* generierten Daten konnten eine differentielle IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression rekapitulieren. Trotz einer vorliegenden homogenen Zellpopulation zeigten die GM-CSF DCs nicht alle und in unterschiedlichem Maß eine Reporterallel-Expression in Abhängigkeit vom Stimulus.

Das hier dargestellte Expressionsmuster führte daher zu der Annahme, dass auch innerhalb dieser phänotypisch in sich homogenen Zellpopulation Unterschiede in der Aktivierbarkeit der Zellen bestehen. Dies wurde durch die differentielle Expression der hier relevanten PRRs bestätigt und belegte, dass die *in vitro* Generierung von GM-CSF DCs zu einer Differenzierung von Zellen führt, die funktionell distinkt sind. Durch Sortierung von polyI:C stimulierten GM-CSF DCs gemäß ihrer Reporterallel-Expression konnte die höchste Expression des jeweils relevanten PRRs der passenden IL-12p40/GFP oder IFN β /YFP exprimierenden Population zugeordnet werden. Somit schienen die Zellen von Anfang an auf eine bestimmte Antwort beschränkt zu sein. Diese lag hier repräsentativ in der IL-12p40/GFP oder der IFN β /YFP Expression. Die die Reporterallele simultan exprimierenden Subpopulationen stellen dabei möglicherweise Zellen dar, die nicht ausdifferenziert und noch nicht vollständig restriktiert sind. Die Annahme der distinkten Funktionalität der jeweiligen IL-12p40/GFP⁺ und IFN β /YFP⁺ Zellen wurde durch die Darstellung der unterschiedlichen Kapazität, OTII T Zell-Proliferation zu stimulieren, bestätigt. Diese korrelierte zum einen mit der IL-12p40/GFP Expression, als auch mit der höchsten Oberflächenexpression des kostimulatorischen Moleküls CD86 und von I-A^b (MHC Klasse II) (s. Abb. 2.30).

Molekulare Ursachen, die der Fähigkeit zur Expression eines bestimmten Zytokins und einer bestimmten Funktion zugrunde liegen, können in einer differentiellen Expression von PRRs und damit einer grundlegenden Responsivität, einer differentiellen Expression von Transkriptionsfaktoren oder der Epigenetik begründet sein. Epigenetische Mechanismen können dabei durch die Modifikation der Chromatinkonformation zu einer Zugänglichkeit des jeweiligen Promotors bzw. der Gensequenz beitragen oder zu dessen Verpackung, was die Transkription dieses Gens verhindert.

Schließlich zeigte die Charakterisierung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in polyI:C stimulierten, gemäß ihrer Reporterallel Expression sortierten GM-CSF DCs, dass es selbst nach Restimulation zu einer konstanten Expression der Zytokine kam (s. Abb. 2.32). Der Transfer der Reporterallel exprimierenden Zellen und die *in vivo* Restimulation mittels CASP konnten zeigen, dass die stabilisierte Zytokinexpression keinen artifiziellen *in vitro* Effekt darstellte (s. Abb. 2.33). Somit war das hier vorgestellte Modell zur Verfolgung der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression ein verlässliches Modell, um die Reporterallel-Expression nach wiederholter Stimulation zu analysieren. Die Stimulierbarkeit der IL-12p40/GFP Expression in GFP⁻/YFP⁻ und GFP⁻/YFP⁺ sortierten Zellen durch die Restimulation mit CpG2216 oder LPS geht mit dem niedrigen Potential von polyI:C IL-12p40 zu induzieren einher (Bode et al., 2009). Die IL-12p40 Transkription wird vor allem durch NF- κ B vermittelt. PolyI:C führt jedoch durch die TRIF/IRF3-abhängige Signalweiterleitung und die Bindung an MDA5 nur zu einer sehr geringen NF- κ B Aktivierung. Der TLR9 Ligand CpG und der TLR4 Ligand LPS führen hingegen über eine MyD88 abhängige Signalweiterleitung zu einer starken NF- κ B Aktivierung und damit zu einer hohen Expression von IL-12p40. Daher konnte die Aktivierung anderer Signalwege

nach CpG2216 und LPS zu einer IL-12p40/GFP Expression in der Restimulation führen. Die geringere IL-12p40/GFP Expression nach CpG2216 oder LPS Stimulation in GFP⁻/YFP⁺ Zellen beruht möglicherweise auf einer dominant negativen IRF3 vermittelten Inhibition des *Il12b* (IL-12p40) Promotors (Negishi et al., 2012). Die ausbleibende neue Induktion der IFN β /YFP Expression nach Restimulation in jeder der sortierten Populationen liegt möglicherweise in der komplexen Transkriptionsinitiation des IFN β Locus begründet (s. Abschnitt 1.6.1.2). Weiterhin fungiert IFN β als Initiatorzytokin während einer frühen Immunantwort und wird möglicherweise im Verlauf einer ablaufenden Immunreaktion in anderen als den anfänglichen Produzenten nicht nachträglich induziert, da diese *per se* dazu nicht in der Lage sind. Diese Zellen, die vor allem durch die GFP⁻/YFP⁻ Zellen repräsentiert waren, zeigen möglicherweise eine vergleichbare Festlegung ihres Zytokinprofils im Bezug auf andere Zytokine als, die hier repräsentativ untersuchten IL-12p40 und IFN β .

Ein Mechanismus, die Expression eines Gens über längere Zeit oder dauerhaft zu steuern, basiert wie bereits angedeutet, auf einer epigenetischen Ebene. Der wichtigste epigenetische Mechanismus besteht in der Regulation der vorliegenden Chromatinstruktur. Über posttranslationale Histonmodifikationen, die Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung etc. beinhalten, kann der Kondensationsgrad der DNS gesteuert werden. Liegt die Chromatinstruktur in einem kondensierten Zustand vor, ist die DNS unzugänglich für Transkriptionsfaktoren. Über die Kooperation von Transkriptionsfaktoren und Chromatin remodelierenden Proteinen kommt es zur Dekondensation und Transkriptionsinitiation (Chi, 2004).

Die Bedeutung der Epigenetik bei der Regulation von Zellen des Immunsystems konnte erstmals in T Zellen gezeigt werden. So kommt es während der T_H1 Polarisierung zu einer irreversiblen epigenetischen Abschaltung des *Il-4* Locus und im Gegenzug zu einer Stabilisierung der Zugänglichkeit des *Ifng* Locus (Grogan et al., 2001). M Φ weisen nach LPS Stimulation eine vorübergehende Irresponsivität gegenüber einer Restimulation auf und eine damit verbundene funktionelle Stabilisierung der Genexpression zweier definierter Gengruppen: Während proinflammatorische Mediatoren durch epigenetische Mechanismen abgeschaltet werden, kommt es zu einer andauernden und restimulierbaren Expression von antimikrobiellen Effektorproteinen. So wird zum einen der Organismus vor einer Immunpathologie geschützt und zum anderen bleiben wichtige Effektormechanismen zur Abwehr induzierbar (Foster et al., 2007). Ähnliche Mechanismen könnten auch im Fall der stabilisierten IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression in dem hier vorgestellten Modell spielen. Eine epigenetische Regulation von IL-12p40 in der Sepsis wurde bisher nur in Langzeitstudien gezeigt. Mäuse zeigen 6 Wochen nach CLP noch eine erniedrigte IL-12p40 Produktion, die durch eine inaktivierende Di-Methylierung des Lysins 27 am Histon 3 (H3K27me2) am *il12p40* Promotor hervorgerufen wird (Wen et al., 2008; Wen et al., 2006). Die IL-12p40 Expression ist weiterhin mit einer Methylierung des Histons H3K4me3 assoziiert und trägt möglicherweise zu der hier vorgestellten stabilisierten Expression bei. Im Bezug auf die IFN β Expression konnte kürzlich gezeigt werden, dass es zu einer Zelltyp-spezifischen H3K9me2 Methylierung kommt (Fang et al., 2012). Diese führt zu einer Repression der IFN β Antwort. Zellen, die als IFN β Produzenten bekannt sind, z.B. DCs, weisen diese Methylierung nicht auf. Im Gegensatz dazu war diese Methylierung in Zellen, die unter normalen Bedingungen kein IFN β produzieren, z.B. Fibroblasten, präsent. Wurde diese Methylierung jedoch in Nicht-Produzenten verhindert, erwiesen sich diese Zellen als potente IFN β Produzenten und waren gegenüber einer Infektion mit dem vesikulärem Stomatitisvirus

resistent. Diese Veröffentlichung lieferte damit einen epigenetischen Erklärungsansatz für eine Zelltyp-spezifische Zytokinexpression. Möglicherweise liegt diese inaktivierende Methylierung auch in den hier vorgestellten IFN β /YFP⁺ GM-CSF DC Subpopulationen vor (s. Abb. 2.32 und 2.33).

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen somit, dass eine virale Primärinfektion zu einer fixierten Zytokinexpression in IL-12 und IFN β produzierenden DCs führt. Im Fall einer Sekundärinfektion kommt es vor allem zu einer Zunahme der sekretierten Zytokinmenge. Zunächst kommt es zu einer optimalen antiviralen Immunantwort. Das Immunsystem ist jedoch nicht in der Lage adäquat auf die folgende Sekundärinfektion zu reagieren, wodurch es zu einer Dysregulation mit anschließender Immunpathologie kommt. Ein Grund für die Unflexibilität des Immunsystems mag darin liegen, dass DCs - als wichtige Verbindung des angeborenen und adaptiven Immunsystems - durch ihren Differenzierungsstatus in ihrem Expressionsprofil von Mediatoren eingeschränkt sind. Aufgrund ihres PRR Expressionsprofils sind sie nicht in angemessener Weise in der Lage sekundäre Stimuli zu integrieren. Sie exprimieren während der Sekundärinfektion die Faktoren, die sie auch während der Primärinfektion exprimierten, jedoch in immunpathologischen Konzentrationen, was zu einem detrimetellen Verlauf der Krankheit führt.

3.3 Ausblick

Für die Modelle der EAE und der polymikrobiellen Peritonitis war bisher bekannt, dass IFN β bzw. Typ I IFN den Verlauf der jeweiligen Krankheit positiv bzw. negativ beeinflussen. Die Charakterisierung der Produzenten konnte erstmals die für die IFN β und ergänzend für IL-12p40 Expression verantwortlichen Zellen auf Einzelzellebene zeigen.

Im Modell der EAE sollte die Funktionalität der IFN β /YFP produzierenden Mikroglia näher charakterisiert werden. Dazu sollten klassische Funktionsassays, z.B. zu Ihrer Kapazität, T Zellproliferation zu stimulieren, oder Phagozytoseassays durchgeführt werden, da diese Eigenschaften *in vivo* eine große Rolle spielen. Die Grundlage für diese Versuche sollte dabei aufgrund der geringen Anzahl IFN β /YFP Produzenten *in vivo* die hier etablierte primäre Mikrogliakultur bilden. Weiterhin liefert die Lokalisierung von Zellen wichtige Anhaltspunkte zu ihrer Funktion. Daher sollte die Etablierung der immunhistochemischen Analyse der IFN β /YFP Produzenten im ZNS während der EAE angestrebt werden. Diese würde die nähere Beschreibung der Umgebung und Interaktionen IFN β /YFP⁺ Mikroglia ermöglichen. Schließlich ist die Überprüfung der protektiven Wirkung IFN β /YFP⁺ im Vergleich zu IFN β /YFP⁻ Mikroglia von hoher Relevanz. In erster Annäherung an eine direkte *in situ* Situation kann diese beispielsweise in organotypischen Schnittkulturen (organotypic slice cultures) nach LPS indizierter Neurodegeneration untersucht werden. Des Weiteren könnte der Einfluss von IFN β /YFP⁺ und IFN β /YFP⁻ transferierten Zellen auf den Verlauf der EAE in IFN β ^{-/-} Mäusen untersucht werden. Um auszuschließen, dass andere Zellen als Mikroglia IFN β /YFP produzieren, sollte die Analyse von Neuronen und Astrozyten unter identischen Bedingungen eingeschlossen werden.

Zur Ergänzung der für die CASP vorgestellten Daten, wäre es sinnvoll die Mauszahlen für die Bestimmung der Überlebenskinetik und der Bestimmung der bakteriellen Last in den jeweiligen Genotypen zu erhöhen, um statistische Signifikanzen zu erreichen. Weiterhin wäre die Bestimmung wichtiger Chemokine wie z.B. CXCL-10 von Bedeutung, da diese möglicherweise durch IFN β oder das Typ I IFN System differentiell reguliert werden und für die Rekrutierung von Effektorzellen entscheidend sind. Zur genaueren Charakterisierung und Bestätigung der Konzentrationsbestimmungen von IL-12p40 und IFN β nach CASP, sollte die Reporterallel-Expression auf Einzelzellebene auf dem IFNARI^{-/-} Hintergrund erfolgen. Diese Untersuchungen würden zusätzlich Aussagen über einen regulatorischen Einfluss von Typ I IFN auf die IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Expression ermöglichen.

Wie bereits gezeigt, weisen die durch die Reporterallel-Expression definierten GM-CSF DCs funktionelle Unterschiede auf. Eine Ausweitung dieser Analysen wäre ebenfalls sinnvoll, um diese Aussagen weiter zu untermauern. Hierzu könnten Phagozytose- und Migrationsassays, sowie *in vivo* Transfers mit funktionellen Untersuchungen durchgeführt werden. Nach den bisher erfolgten Analysen der IL-12p40/GFP und IFN β /YFP Produzenten bleibt die Frage offen, ob diese Zellen eingewanderte oder residente Zellen der jeweiligen Organe darstellen. Durch Inhibition der Migration mittels PTX wäre die Klärung dieser Frage möglich. Die größte Aufmerksamkeit sollte jedoch auf die Klärung der Stabilisierung des Zytokinexpressionsmusters nach Stimulation gerichtet werden. Ergänzend könnte durch intrazelluläre Färbung mittels Durchflusszytometrie untersucht werden, ob die hier definierten Populationen weitere Unterschiede in der Zytokinexpression

aufweisen und ob die GFP⁻/YFP⁻ Zellen weitere Zellpopulationen beinhalten, die sich auf die Produktion eines bestimmten Zytokins spezialisiert haben. Wie in der Diskussion erwähnt, wird die IFN β Expression unter anderem auch durch epigenetische Mechanismen reguliert, die auf der H3K9me2 Methylierung des IFN β Locus beruht. Die Anwesenheit dieser Methylierung könnte ebenfalls innerhalb der durch die Expression des Reporterallels definierten Populationen relevant sein. Dies würde die Hypothese der Spezialisierung der Zytokinsekretion durch eine bestimmte Zelle weiter untermauern. Auch in diesem Kontext sollte die Zytokinexpression in Reportermäusen auf dem IFNARI^{-/-} Hintergrund erfolgen, um eine regulatorische Wirkung des Typ I IFN ausschließen zu können.

4. Material und Methoden

4.1 Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Adjuvant complete Freund H37RA	Difco Laboratories, Detroit
Avidin/Biotin Blockierlösungen	Vector Laboratories, Burlingame, USA
β-Mercaptoethanol (ME)	Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin	Sigma, Taufkirchen
DEPC	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotide	Roche, Mannheim
destilliertes Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM Medium VLE	Biochrom, Berlin
DMSO	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Morphisto, Frankfurt am Main
Esel-Normal-Serum	Jackson Laboratories, Suffolk, UK
Ethanol	Merck, Darmstadt
FACS Clean Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
FCS	PAN, Aidenbach
IMDM	Lonza, Verviers
Kaliumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Kochsalzlösung, physiologisch	DeltaSelect, Dreieich
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Maus-Normal Serum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Myelin Oligodendrozyten-Glykoprotein 35-55	Biotrend, Köln
Mycobacterium tuberculosis H37RA	Difco Laboratories, Detroit
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
OVA-Peptid 323-339	Pineda Antikörper Service, Berlin
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS Chemikalienpulver	Biochrom, Berlin
PBS, 0,5 l, steril	Invitrogen, Karlsruhe
PBS, 10 x	Gibco, Paisley
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Percoll	GE Healthcare, Freiburg
Pertussis Toxin aus <i>Bordetella pertussis</i>	Sigma, Steinheim
Ratten-Normal Serum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
RNase Zap	Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt

RPMI 1640 VLE	Biochrom, Berlin
SA-APC Alexa 750	Invitrogen, Karlsruhe
Saccharose	Serva, Heidelberg
SA-Cy3	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SA-PE Cy7	BD Biosciences, Heidelberg
SA-PerCP Cy5.5	BD Biosciences, Heidelberg
TissueTek™ O.C.T. Compound™	Sakura, Zoeterwoelde
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Triton 100X	Biochrom, Berlin
Vectashield Eindeckelmedium mit DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30%ig	Merck, Darmstadt
Ziege-Normal Serum	DakoCytomation, Hamburg

4.1.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Collagenase Typ VIII	Sigma, Taufkirchen
Collagenase/Dispase	Roche, Mannheim
SuperScript III	Roche, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA, 0,25%	Gibco, Paisley

4.1.3 Narkotika

Narkotikum	Konzentration	Bezugsquelle
Narketan	100 mg/ml	Vetoquinol GmbH, Ravensburg
Xylapan	20 mg/ml	Chassot GmbH, Ravensburg

4.1.4 Kits und andere Reagenzien

Kit/Reagenz	Bezugsquelle
BD AccuDrop Beads	BD Biosciences, Heidelberg
BD Compensation Beads	BD Biosciences, Heidelberg
BD Phosflow Starter Kit + α P-STAT1	BD Biosciences, Heidelberg
Fluka RNS Isolation Kit	Sigma Aldrich,
Miltenyi CD4 T Zell-Isolationskit	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
mirVana miRNS Isolationskit	Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt
TissueTek Einbettmedium	Sakura Finetek, Staufen
TSA FITC/Biotin System	Perkin Elmer, Rodgau

4.1.5 TLR-Agonisten

TLR-Agonist	Bezugsquelle
CpG ODN 2216	TIB MolBiol, Berlin
LPS (<i>Salmonella minnesota</i>)	List Biological Laboratories, Campbell, California
polyI:C	GE Healthcare, Freiburg
wobble ssDNS	

4.1.6 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
α Biotin MACS Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
COS-Blutagar-Platten	Biomerieux, Nürtingen
Dako Cytomation Pen	Dako Cytomation, Hamburg
Cryomold	Sakura Finetek, Staufen
LS MACS Säulen und Magnete	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotomklingen	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Nahtmaterial Nylon DSM13 (5/0, 7/0)	Resorba, Nürnberg
Objektträger Super Frost	Roth, Karlsruhe
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden
	BD Falcon, Heidelberg
	Eppendorf, Hamburg
	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Corning, Amsterdam, Niederlande
	Neolab, Heidelberg
	BD Biosciences, Heidelberg
Siebgewebe MW=70 & 100 μ m	Neolab, Heidelberg
Venenverweilkanüle BD Venflon™ Pro	BD Infusion Therapy AB, Schweden

4.1.7 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Axiovert 11 (Mikroskop)	Zeiss, Jena
Brutschrank (Heraeus HeraCell 240)	Heraeus, Hanau
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools, Heidelberg
Clean Air (Sterilbank)	Kendro, Wien
Cryotom (HM 650)	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Ein- und Multikanalpipetten	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Einfriercontainer	Nalgene Laboratories, Rochester
FACS Aria I	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Iq-5 Cycler	Bio-Rad, München
Multistep-Dispenser Handystep	Brand, Wertheim
Heidolph Polymax 1040 (Plattformschüttler)	Heidolph Instruments, Schwabach
Heizblock Techne DB3	Biostep, Jahnsdorf

Heizrührer IKAMAG RCT	IKA, Staufen
Millipore-Anlage	Millipore, Schwabach
NanoDrop 1000	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
pH-Meter MP225	Mettler-Toledo, Giessen
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Rotana 46 RC (Stand-Kühlzentrifuge)	Hettich, Tuttlingen
stereotaktischer Rahmen	Stoelting, USA
Szintillationszähler 1205 Betaplatte	LKB Wallac, Finnland
TE2000 (Mikroskop)	Nikon, Düsseldorf
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turrax T25	IKA, Staufen
Vortex Schüttler VVR	VWR, Darmstadt
Waage Precisa 600c	Oehmen Labortechnik, Essen
TE2000 (Mikroskop)	Nikon, Düsseldorf
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallsonde Labsonic U	B. Braun, Melsungen
Zellerntegerät Basic 96 Harvester	Zinser Analytic Skatron, Frankfurt
Zentrifuge miniSpin	Eppendorff, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorff, Hamburg

4.2 Medien, Zelllinien und Puffer

4.2.1 Zellkulturmedien

Tabelle 4.1 Zellkulturmedien

Zellen	Konzentration	Bestandteile
adulte Mikroglia & BMDMs	10 % (v/v)	RPMI 1640 VLE
	0,05 mM	FCS
	15 % (v/v)	β-ME
GM-CSF DCs	15 % (v/v)	M-CSF (aus L929-Überstand)
	10 % (v/v)	DMEM VLE
	0,05 mM	FCS
naive T Zellen	1,5 % (v/v)	β-ME
	10 % (v/v)	GM-CSF (aus P3X63/O-Überstand)
	0,05 mM	RPMI 1640 VLE
HT1080	10 % (v/v)	FCS
	1 % (v/v)	β-ME
	0,05 mM	PenStrep
P3X63/O-GM-CSF	10 % (v/v)	IMDM
	5 % (v/v)	FCS
	2 mM	L-Glutamin
	0,05 mM	β-ME

Einfriermedium	50 % (v/v)	Kulturmedium
	40 % (v/v)	FCS
	10 % (v/v)	DMSO

4.2.2 Zelllinien und Zellen

Tabelle 4.2 Zelllinien und Zellen

Zelllinie/Zellen	Eigenschaften	Referenz
P3X63/O-GM-CSF	murine Myelom-Zelllinie, produziert GM-CSF	Karayusama und Melchers <i>et al.</i> , 1988
GM-CSF DCs	Generierung von cDCs mittels GM-CSF	Inaba <i>et al.</i> , 1992
BMDMs	Generierung von BMDMs mittels M-CSF in L929 konditioniertem Medium	Boltz-Nitulescu <i>et al.</i> , 1987
adulte Mikroglia	Kultivierung aus Gehirn und Rückenmark adulter Mäuse	Ponomarev <i>et al.</i> , 2006
naive T Zellen	Kultivierung nach MACS-Aufreinigung primären Splenozyten und Lymphknoten	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
HT1080	Fibrosarkom, human	ATCC: CCL-121 TM

4.2.3 Puffer

Tabelle 4.3 Puffer

Collagenase VIII	100 mg/ml	in PBS
Collagenase/Dispase	10 mg/ml	in PBS
DNase I	3000 U/ml	in PBS
FACS-Puffer	1 x	PBS
	2 % (v/v)	FCS
	2 mM	EDTA
MACS-Puffer	1 x	PBS
	0,5 % (w/v)	BSA
	2 mM	EDTA
Organ-Verdaupuffer	6 % (v/v)	Collagenase Typ VIII
	1 % (v/v)	DNase I Lösung
	93 % (v/v)	PBS
PBS	13,7 mM	NaCl
pH 7,4	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	4 % (w/v)	Paraformaldehyd
PFA-Fixierpuffer pH 7,4 (NaOH, HCl)	2 mM	MgCl ₂

	1,25 mM	EGTA
	1 x	PBS
Stop-Puffer	1 %x	PBS
	10 mM EDTA	EDTA
TNB	0,1 M	Tris-HCl, pH 7,5
	0,15 M	NaCl
	0,5 % (w/v)	Block-Reagenz aus TSA-Kit

4.3 Oligonukleotide und Antikörper

4.3.1 Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma Metabion bezogen. Diese waren bereits auf 100 µM voreingestellt. Die Endkonzentration war 20 µM. Die jeweiligen Sonden wurden von der Firma Roche bezogen.

Tabelle 4.4 Primer

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')	Position	Sonde
β -actin	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA	1009 - 1028	106
	CGC TCA GGA GGA GCA ATG	1066 - 1083	106
CD3ε	AAC ACG TAC TTG TAC TTG TAC CTG AAA ACT C	608 - 628	10
	GAT GAT TAT GGC TAC TGC TGT CA	659 - 679	10
FoxP3	GCA TGT AGA GGC CAT CAA AGA	112 - 130	79
	CGG GTC TGC ACA CAT GTT A	167 - 187	79
GM-CSF	GCA TGT AGA GGC CAT CAA AGA	382 - 402	79
	CGG GTC TGC ACA CAT GTT A	486 - 504	79
IFNβ	CAG GCA ACC TTT AAG CAT CAG	349 - 373	95
	CCT TTG ACC TTT CAA ATG CAG	404 - 426	95
IFNγ	ATC TGG AGG AAC TGG CAA A	266 - 285	21
	TTC AAG ACT TCA AAG AGT CTG AGG	331 - 354	21
IL-17a	TGT GAA GGT CAA CCT CAA AGT C	195 - 216	50
	AGG GAT ATC TAT CAG GGT CTT CAT T	301 - 325	50
IL-23p19	TCC CTA CTA GGA CTC AGC CAA C	494 - 515	19
	TGG GCA TCT GTT GGG TCT	543 - 560	19
Isg56	TCT AAA CAG GGC CTT GCA G	886 - 904	6
	GCA GAG CCC TTT TTG ATA ATG GT	928 - 949	6
RORγt	ACCTCT TTT CAC GGG AGG A	953 -971	6
	TCC CAC ATC TCC CAC ATT G	995 - 1013	6
T-bet	TCA ACC AGC ACCA GAC AGA G	640 - 659	19
	AAA CAT CCT GTA ATG GCT TGT C	728 - 749	19

4.3.2 Antikörper

Tabelle 4.5 Antikörper

Antikörper	Klon	Verwendung	Bezugsquelle
Esel α Hase	polyklonal	Histologie	Jackson Immuno Research, Suffolk
α B220	Ra3-6B2	FACS/Histologie	BD Biosciences, Heidelberg
α CD3 ϵ	145-2C11	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
α CD8 α	53-6.7	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
α CD11b	M1/70	FACS/Histologie	BD Biosciences, Heidelberg
α CD11c	HL3	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
α CD16/CD32	HL3	FACS/Histologie	BioLegend, London
α CD19	1D3	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
α CD45.1	A20	FACS	BioLegend, London
α CD45.2	104	FACS	BioLegend, London
α CD86	GL1	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
α F4/80	BM8	FACS	BioLegend, London
α GFP	polyclonal	Histologie	Abcam, Cambridge
α Gr1	RB6-8C5	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
α IL-12p40	C17.8	Histologie	BioLegend, London

4.4 Tierversuche

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß des Tierschutzgesetzes § 8 und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt.

4.4.1 Versuchstiere

Die verwendeten Mäuse wurden im spezifisch-pathogenfreien (SPF)- Bereich der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf gehalten und gezüchtet. IFN β ^{mob/mob} Mäuse waren zum Zeitpunkt der Arbeitsaufnahme mindestens über 10 Generationen auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt.

Tabelle 4.6 Versuchstiere

verwendete Mauslinie	Beschreibung
IFN β ^{mob/mob}	IFN β Reportermaus (Scheu et al., 2008)
IL-12p40 ^{get40/get40}	IL-12p40 Reportermaus (Reinhardt et al., 2006)
IL-12p40 ^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob}	IL-12p40 x IFN β Doppel-Reportermaus
IFN β ^{-/-}	<i>Ifnb</i> Knockout-Maus (Erlandsson et al., 1998)
IFNARI ^{-/-}	<i>Ifnar1</i> Knockout-Maus (Hwang et al., 1995)
B6.SJL-Ptprc<a>Pepc/BoyJ	kongener Mausstamm, CD45.1 ⁺ (Shen et al., 1985)
OTII-transgene	transgener TZR spezifisch für OVA ₃₂₃₋₃₃₉ (Robertson et al., 2000)

4.4.1.1 Das IFN β Reportermausmodell

Die Analyse der IFN β Antwort nach Stimulation mit definierten PAMPs und während einer autoimmunen Inflammation erfolgte mit Hilfe des bicistronischen IFN $\beta^{mob/mob}$ Reportermausmodells. In den endogenen *Ifnb* Locus wurde eine für das verbesserte gelb fluoreszierende Protein (eYFP) kodierende Expressionskassette mit einer separaten internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) bicistronisch eingefügt. Um eine Dysregulation der IFN β Produktion zu vermeiden, wurden die Expressions-Kontrollelemente und Polyadenylierungssignale des endogenen *Ifnb* erhalten (Scheu et al., 2008). Bei einer Expression des Reporter-Allels, welches als *mob* „messenger of interferon beta“ bezeichnet wird, wird neben IFN β simultan das Fluoreszenzprotein eYFP exprimiert. Während das Zytokin sekretiert wird, akkumuliert das YFP im Zytoplasma der Zelle und ermöglicht die Analyse der IFN β Antwort auf Einzel-Zellebene mittels durchflusszytometrischer und immunhistologischer Methoden.

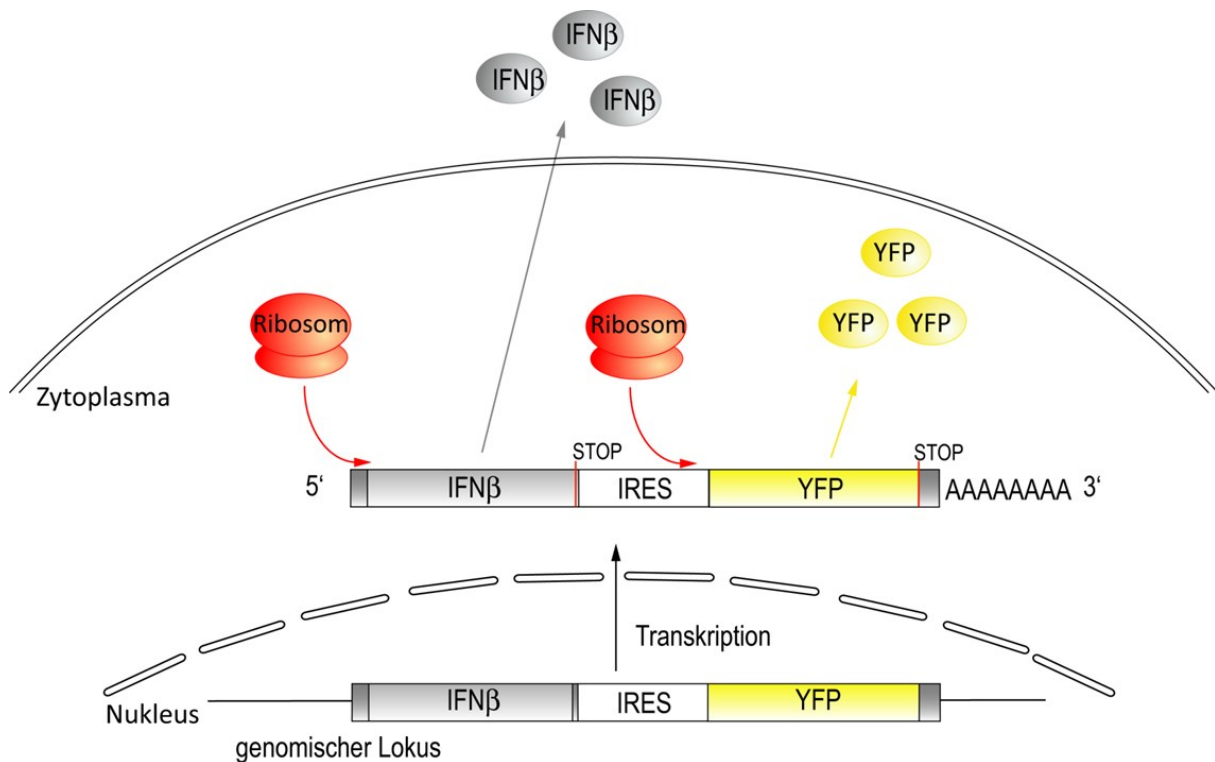


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des bicistronischen IFN $\beta^{mob/mob}$ Reporter-Mausmodells. Modifiziert nach Dresing Philipp: *In vitro* und *in vivo* Charakterisierung von IFN beta exprimierenden Zellen mittels eines bicistronischen Fluoreszenz-Reportermausmodells, Dissertation

4.4.1.2 Das IL-12p40 x IFN β Doppel-Reportermausmodell

Die in Abschnitt 4.4.1.1 beschriebene IFN $\beta^{mob/mob}$ Reportermaus wurde mit einer IL-12p40^{get40/get40} Reportermaus gekreuzt, die analog zur *mob* Maus generiert wurde. Hierbei wurde eine für das verstärkte grün fluoreszierende Reporterprotein kodierende Kassette hinter das Stopcodon der IL-12p40 Information mittels einer IRES gekoppelt. Das eGFP wird simultan mit IL-12p40 transkribiert und translatiert, wodurch es die IL-12p40 Expression anzeigt (Reinhardt et al., 2006)

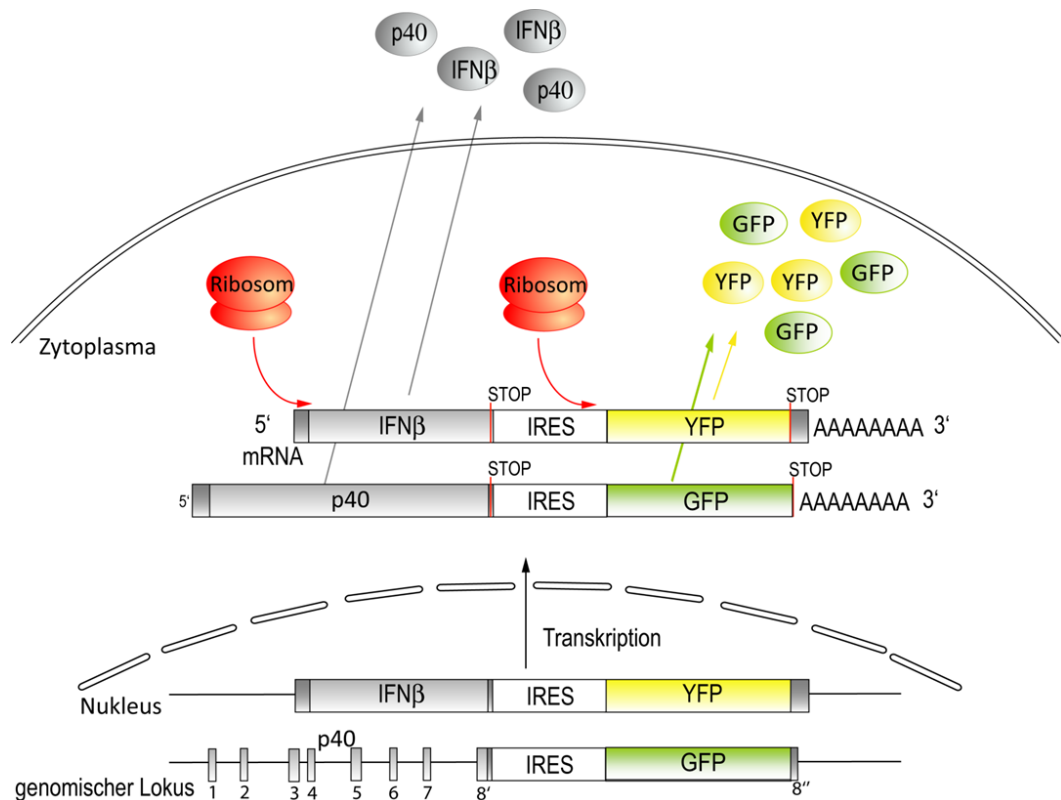


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der IL-12p40^{get40/get40} x IFN β ^{mob/mob} Doppelreporter-Mausmodells. Modifiziert nach Dresing Philipp: *In vitro* und *in vivo* Charakterisierung von IFN beta exprimierenden Zellen mittels eines bicistronischen Fluoreszenz-Reportermausmodells, Dissertation

4.4.2 Methoden der EAE

4.4.2.1 Induktion der EAE

Die EAE ist ein anerkanntes Tiermodell für die Multiple Sklerose (MS). Ähnlich zur MS, kommt es im Verlauf der EAE zu Lähmungserscheinungen in den Extremitäten, die auf einer autoimmunen Inflammation im ZNS beruhen. Diese führt zu einer Demyelinisierung von Axonen in Rückenmark und Gehirn mit nachfolgender Neurodegeneration. Die EAE kann mittels aktiver oder passiver Immunisierung induziert werden. Bei der aktiven Immunisierung wurden C57BL/6 Mäuse mit dem synthetischen enzephalitogenen Peptid des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG₃₅₋₅₅) in Verbindung mit dem Kompletten Freund-Adjuvants (CFA mit zusätzlichen *M. tuberculosis* 10 μ g/ml) subkutan in die Flanken und die Schwanzbasis injiziert. Zur Verstärkung der autoimmunen Antwort und Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke wurde das Pertussis-Toxin (PTX) verabreicht. Bei der passiven Immunisierung werden autoimmune T Zellen, die einer immunisierten Donor-Maus entnommen und *in vitro* mit MOG₃₅₋₅₅ restimuliert wurden, in eine naive Rezipienten-Maus injiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde die EAE mittels aktiver Immunisierung hervorgerufen.

Für die Immunisierung wurden weibliche 8-10 Wochen alte C57BL/6 und IFN β ^{mob/mob} Mäuse verwendet. Nach einer Betäubung mit Ketamin und Xylazin, wurden den Mäusen 100 μ l des Inokulums subkutan in die Schwanzbasis und jeweils 50 μ l in die Flanken injiziert. Anschließend und nach 48 h wurden 200 ng PTX in 200 μ l PBS intraperitoneal appliziert.

4.4.2.2 Herstellung des Inokulums

Pro Maus wurde in einem Gesamtvolumen von 200 µl eine Emulsion aus 100 µl CFA, 200 µg MOG₃₅₋₅₅ (2 mg/ml) und 60 µl PBS mittels Ultraschallsonde hergestellt. Dabei wurde die Emulsion stets gekühlt, um eine Denaturierung des MOG-Peptids zu verhindern. Das Inokulum wurde anschließend mittels 1 ml Einwegspritze und 23 G Kanüle subkutan injiziert.

4.4.2.3 Klinische Evaluation des Krankheitsverlaufs

Die Versuchstiere wurden täglich bezüglich ihres Allgemeinzustandes kontrolliert. Der Schweregrad der Lähmung wurde ab dem 10-12 Tag nach Immunisierung, mit dem in Tabelle 4.2 aufgeführten klinischen Score bewertet und dokumentiert. In der akuten Phase bis zur Remission wurde den Tieren feuchtes Futter und Wasser am Boden präsentiert. Mäuse, die während der EAE einen klinischen EAE Score von 3,0 zeigten, wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet (Abbruchkriterium).

Tabelle 4.7 Klassifizierung des Krankheitsverlaufs

Score	Lähmungserscheinung
0	keine Symptome
0,5	partielle Schwanzlähmung
1,0	vollständige Schwanzlähmung
1,5	unilaterale Hinterbeinlähmung
2,0	bilaterale Hinterbeinlähmung
2,5	bilaterale Hinterbeinlähmung mit unilateraler Vorderbeinschwäche
3	Tetraparese (Abbruchkriterium)
4	Tod

4.4.2.4 Präparation von Milz und Lymphknoten

Die Mäuse wurden nach zervikaler Dislokation fixiert, die isolierten Organe wurden in 5 cm Petrischalen in 2-3 ml Organverdaupuffer überführt und mit Hilfe zweier Pinzetten zerrissen. Anschließend wurde die Suspension für 25-30 min bei 37 °C inkubiert. Die verdauten Organe wurden durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Die Reaktion wurde mit ca. 10 ml Stop-Puffer abgestoppt und über ein 70-100 µm Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 5 min bei 4 °C pelletiert und nach Lyse der Erythrozyten in 10 ml PBS resuspendiert und mittels Neubauer-Kammer gezählt.

4.4.2.5 Perfusion und Entnahme von Rückenmark und Gehirn

Sowohl für die FACS-Analyse, als auch die histologische Analyse ist es notwendig das Blut *in situ* aus dem Gewebe zu waschen. Dies erlaubt die Analyse von Zellen, die sich ausschließlich im Gewebe befinden und verhindert eine Verunreinigung durch Zellen, die sich in Blutgefäßen befinden. Hierzu wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5mg/kg) narkotisiert. Der Thorax wurde eröffnet und ein Entlastungsschnitt an der *Vena cava inferior* durchgeführt. Eine 20 G Kanüle wurde in die rechte Herzkammer zügig eingeführt und der Blutkreislauf wurde im Fall einer folgenden FACS-Analyse mit 50 ml PBS und im Fall einer folgenden histologischen Analyse mit 20 ml PBS und 30 ml 4 % PFA-Fixierpuffer gespült. Die Organe wurden vorsichtig herauspräpariert und für die FACS-Analyse wie in Abschnitt 4.4.2.4 und 4.7.4 behandelt. Für die Anfertigung von histologischen Präparaten wurden die Organe über Nacht bei 4 °C in 4 % PFA-Fixierpuffer nachfixiert. Daraufaufgehend wurden die Organe in PBS gewaschen und in TissueTek Einbettmedium eingebettet. Nach dem Einfrieren in Trockeneis-gekühltem 2-Methyl-Butan wurden die Organe bei -80 °C bis zum Anfertigen der Gefrierschnitte gelagert.

4.4.2.6 Intrathekale Stimulation mit PAMPs

Die intrathekale Stimulation mit PAMPs wurde von Dr. Michael Gliem durchgeführt (Neurologische Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf). Die Mäuse wurden mittels Isofluran anästhesiert und in eine stereotaktische Vorrichtung eingespannt. Der Schädelknochen wurde vorsichtig freipräpariert und mit Hilfe eines Bohrers wurde im Schädelknochen ein Fenster zum linken Lateralventrikel eröffnet. Die Koordinaten relativ zum Bregma betragen -0,3 mm anterior/posterior, +1,0 mm medial/lateral und -3,0 mm dorsal/ventral. Anschließend wurden zur Stimulation mit einer Mikroinjektionskanüle 6 µg polyI:C/PBS verabreicht. 24 h später wurden die Gehirne wie unter 4.4.2.5 beschrieben isoliert. Für die anschließende FACS Analyse wurde wie unter 4.4.2.7 und 4.7.3 weitervorgegangen. Für die immunhistochemische Analyse wurde das Gewebe wie unter 4.7.2 beschrieben, vorgegangen.

4.4.2.7 Isolation mononukleärer Zellen aus dem ZNS

Zur Isolation von mononukleären Zellen aus Rückenmark und Gehirn wurden naive oder EAE induzierte Mäuse an d17 mit PBS perfundiert und die Organe isoliert (s. 4.4.2.5). In einer unbeschichteten 5 cm Petrischale wurden die Organe, getrennt voneinander, mit Hilfe einer Schere und einer 5 ml Spritze mit einer 18 G Kanüle in PBS/10 % FCS und 750 µl Collagenase/Dispase (10mg/ml) zerkleinert. Anschließend wurden die Organe für 45 min bei 37 °C inkubiert, mit einer erneuten Inkubation für 45 min bei 37°C nach Zugabe von 1,5 ml DNase I (3000 U/ml, Tab) und wiederholtem Auf- und Abpipettieren. Die Einzelzellsuspensionen wurden über ein Siebgewebe (70-100 µm) in ein 50 ml Probenröhrchen überführt und mit 50 ml PBS/10% FCS gewaschen und pelletiert (1200 rpm, 10 min, 4 °C). Zur Isolierung der mononukleären Zellen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll (30 % und 70 %) durchgeführt. Hierfür wurde eine 100

%ige isotonische Percoll-Lösung bestehend aus 90 % Percoll und 10 % 10 x PBS hergestellt. Die 70 % Percoll-Lösung wurde mit PBS/10 % FCS und die 30 % ige Percoll-Lösung mit PBS angesetzt. Das Pellet wurde in 20 ml der 70 % Percoll-Lösung resuspendiert und mit 20 ml der 30 % igen Percoll-Lösung vorsichtig überschichtet. Der Gradient wurde für 20 min bei 2130 rpm ohne schnelle Beschleunigung und Rotorbremse bei RT zentrifugiert, um eine Durchmischung der Phasen zu verhindern. Nach der Zentrifugation befanden sich Zellreste und Erythrozyten im Pellet und das Myelin auf der oberen Phase. Die mononukleären Zellen waren in der Interphase zwischen den 30 und 70 %igen Percoll-Lösungen zu finden. Zunächst wurde die Myelinschicht mit einer Vakuumpumpe vorsichtig abgesaugt. Dann folgte die vorsichtige Abnahme der mononukleären Zellen mittels Serumpipette aus der Interphase. Die Zellen wurden in ein mit PBS/10 % FCS gefülltes 50 ml Probenröhrchen überführt. Um restliches Percoll zu beseitigen wurden die Zellen zweimal mit PBS/10 % FCS gewaschen und pelletiert (1. 15 min, 1500 rpm, 4 °C; 2. 1200 rpm, 10 min, 4 °C). Zuletzt wurden die Zellen gezählt und in 1-2 ml PBS/10 % FCS aufgenommen und mittels Neubauer-Kammer gezählt. Die Zellen wurden nun per FACS-Analyse (Abschnitt 4.7.3) weiter analysiert oder mit TLR-Agonisten restimuliert (Abschnitt 4.4.2.8).

4.4.2.8 Re/Stimulation von intazerebralen Leukozyten

Die mittels Percoll-Gradient aufgereinigten mononukleären Zellen aus Rückenmark und Gehirn wurden in nicht-Zellkultur-behandelte 6-Loch-Platten eingesät (5×10^5 Zellen/Loch). Nach einer 1 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit TLR-Agonisten wie polyI:C (50 µg/ml), LPS (100 ng/ml), CpG2216 (6 µg/ml) und wobble DNS (400 ng/ml) für 24 h stimuliert. Diese Zellen wurden anschließend mittels FACS (Abschnitt 4.7.3) analysiert.

4.4.3 Methoden der CASP

4.4.3.1 Colon ascendens Stent Peritonitis

Bei der CASP wird durch das Einführen eines Venenverweilkatheters eine ständige Öffnung zwischen dem Lumen des Colons und der Peritonealhöhle geschaffen. Dadurch treten Faeces in das Peritoneum aus und führen zu einer Peritonitis mit anschließender systemischer Inflammation. Hierfür wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5mg/kg) narkotisiert. Vor der Operation wurde der Venenverweilkatheter mit einer Schere ca. 3 mm nach Beginn der Plastikummantelung zirkulär eingeritzt, um einen besseren Halt des Fadens zu erreichen. Die Maus wurde anschließend mittels Klebeband am Operationstisch fixiert und mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Die Haut wurde mit einer feinen Pinzette leicht angehoben. Zuerst erfolgte ein Hautschnitt mit einer Schere auf einer Länge von ca. 1,5 cm mit einem folgenden Schnitt der Bauchmuskelfaszie entlang der Linea alba. Das Zoekum wurde mittels zweier angefeuchteter Wattestäbchen aufgesucht und zusammen mit dem terminalen Ileum und Colon ascendens vorsichtig herausgehoben. Vor dem Einführen des Venenverweilkatheters erfolgte zunächst die Fixierung des Fadens an der Darmwand mit einem chirurgischen Knoten. Dabei lag die Einstichstelle ca. 0,5 cm kaudal des Zoekum. Der Verweilkatheter wurde unmittelbar oral vom Faden ca. 0,3-0,5 cm tief eingeführt und mit der vorgelegten Naht fixiert. Zuerst wurde nur der Katheter umschlungen und

dann wurde der Katheter an der Darmwand oberhalb der Einstichstelle fixiert. Der Faden wurde abgeschnitten, sowie auch die Plastikhülle des Verweilkatheters 1 mm oberhalb der Serosa des Darmes. Durch vorsichtigen Druck auf das Zoekum wurde der Stent mit Faeces gefüllt. Anschließend wurde der Darm zurück in die Bauchhöhle gelegt, so dass der Stent vom Darm nicht zugedrückt wurde und ein Influx von Faeces in die Peritonealhöhle erfolgen konnte. Um ein Austrocknen der Maus zu vermeiden wurden 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung in die Bauchhöhle appliziert. Zum Verschluss wurden die Faszien und Muskulatur mittels eines 7/0 Fadens und die Haut mittels eines 5/0 Fadens mit einer fortlaufenden Naht verschlossen.

4.4.3.2 Überlebenskinetik

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Analogons für virale dsRNS poly:I:C (Tab. 4.1.5) auf den Verlauf der CASP untersucht. Hierfür wurden 8-12 Wochen alte, weibliche C57BL/6 Mäuse naiv belassen oder vor der CASP Operation mit zwei verschiedenen Dosen poly:I:C (20 und 200 µg/Maus) stimuliert. 24 h nach der Stimulation wurden die Mäuse wie oben beschrieben operiert und das Überleben wurde alle 2-4 h kontrolliert. Die CASP wurde hierfür mit 14 G Stents durchgeführt. Falls Tiere eine Schnappatmung aufwiesen und nicht mehr in der Lage waren sich zu bewegen, wurden diese schmerzfrei geopfert. Insgesamt wurden die Tiere für 96 h beobachtet und am Ende der Überwachungszeit ebenfalls schmerzfrei geopfert.

4.4.3.3 Entnahme der Peritoneallavage

Das Versuchstier wurde wie bereits beschrieben in Narkose versetzt (s. Abschnitt 4.4.2.5) und, auf dem Rücken liegend, an den Vorder- und Hinterläufen mit Klebeband an den Operationstisch fixiert. Nach Desinfektion mit 70 %igem Ethanol wurde für die Entnahme der Peritoneallavage die Haut parallel zur Operationsnaht mit einer Schere eröffnet. Zur Gewinnung der Peritoneallavage für die Bestimmung der bakteriellen Last und der Zytokinkonzentration mittels ELISA wurden mit einer Spritze 2 ml sterile PBS-Lösung in die Bauchhöhle injiziert, wovon anschließend ca. 1 ml aspiriert werden konnte. Diese Lavage wurde anschließend zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4 °C) und das Pellet der zweiten Lavage hinzugefügt. Um die Infiltrate in die Bauchhöhle mittels FACS analysieren zu können wurden erneut 5 ml steriles PBS injiziert und aspiriert. Die Proben, die der Zytokinbestimmung dienten, wurden bei -20 °C gelagert.

4.4.3.4 Blutentnahme

Die Blutentnahme bei CASP-operierten Tieren erfolgte nach Narkotisierung und Entnahme der Peritoneallavage wie bereits beschrieben (s. 4.4.3.3). Dazu wurde die Bauchhöhle eröffnet und das Blut wurde mittels einer 20 G Kanüle und einer 1 ml Spritze aus der *Vena cava inferior* kaudal der Mündung der *Venae hepaticae* aspiriert. Zur Bestimmung der Serum-Zytokinkonzentration wurde das Serum durch Gerinnen des Blutes gewonnen. Dazu wurde das Blut zweimal für 5-10 min bei RT inkubiert und jeweils für 10 min bei 13.000 rpm in einer Mikrofuge zentrifugiert. Für die Analyse wurde der Überstand verwendet und bei -20 °C gelagert.

4.4.3.5 Bestimmung der Bakterienlast im Peritoneum und der Milz

Die Peritonealhöhle wurde zunächst mit 2 ml sterilem PBS gespült. Für die Bestimmung der Bakterienlast wurde die Lavage abzentrifugiert und 100 µl aus dem Überstand wurden seriell in 1:10 Verdünnungen in sterilem PBS bis zu einem Verdünnungsfaktor von 10^{-8} verdünnt. Die letzten vier Verdünnungen wurden jeweils auf Blutagar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Bestimmung der Bakterienlast in der Milz wurde diese vorsichtig entnommen und in 3 ml sterilem Organ-Verdaupuffer homogenisiert. 100 µl der Suspension wurden seriell in 1:10 Verdünnungen bis zu einem Verdünnungsfaktor von 10^{-6} verdünnt. Auch hier wurden die letzten vier Verdünnungsstufen ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Kolonien gezählt und die Bakterienlast berechnet.

4.4.3.6 *In vivo* TLR Agonist Stimulation

8-12 Wochen alte adulte Mäuse wurden mit poly(I:C) und DOTAP komplexiertem CpG ODN 2216 stimuliert. Die Injektionslösungen pro Maus wurden auf folgende Weise zubereitet:

Tabelle 4.8 *In vivo* TLR Stimulation

poly(I:C)	CpG 2216
<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg poly(I:C) • ad 300 µl mit PBS 	<ul style="list-style-type: none"> • 1,5 nM (10 µg) CpG ODNs ad 100 µl mit HBS, mischen • 30 µl DOTAP mit 70 µl HBS mischen • ODN Lösung mit Liposomen-Lösung durch repetitives pipettieren vermischen und 15 min bei RT inkubieren hierbei Glas- oder Polystyrol-Reaktionsgefäße nutzen

Vor der *i.v.* Injektion in die laterale Schwanzvene, wurde die Versuchsmaus mit einer Rotlichtlampe bestrahlt, um eine Dilatation der Schwanzvene zu induzieren. Nach Desinfektion des Einstichbereiches erfolgte die Injektion der Lösungen mit sterilen Einwegspritzen mit 30 Gauge Kanülen.

4.4.3.7 Präparation von Knochenmarkszellen

GM-CSF DCs aus IL-12p40^{get40/get40} x IFNβ^{mob/mob} Doppel-Reportermausen wurden nach Protokoll generiert (s. 4.4.3.8). An d9 der Differenzierung wurden die Zellen mit 50 µg/ml polyI:C stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und gemäß ihrer Reporterallel-Expression sortiert (s. 4.7.3.3). Anschließend wurden die sortierten Zellen mittels Neubauer-Kammer gezählt und 5×10^6 Zellen jeder Population wurden in je zwei CD45.1⁺ (B6.SJL-Ptprc<a> Pepc/BoyJ) Mäuse *i.v.* injiziert. Am

nächsten Morgen wurden die Rezipienten-Mäuse CASP-operiert. Nach 24 h wurden die Milzen isoliert und auf CD45.2⁺ Zellen und ihre Reporterallel-Expression analysiert.

4.4.3.8 *In vivo* Restimulation von sortierten GM-CSF DCs

Aus 6-12 Wochen alten Tieren wurden *Femur* und *Tibia* entnommen und vom umgebenden Muskelgewebe befreit. Die Knochen wurden für 2-5 min in 70 % EtOH desinfiziert und anschließend in eine Petrischale (Ø 5cm) mit kaltem PBS überführt. Die Knochenenden wurden abgetrennt und das Knochenmark mit einer mit Medium gefüllten Einwegspritze und einer 23 G Kanüle in eine Petrischale aus den Knochen gespült. Das Knochenmark wurde in 50 ml Spitzbodenröhrchen überführt und durch repetitives Auf- und Abpipettieren zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 5 min bei 4 °C pelletiert. Nach einer 3 minütigen Lyse der Erythrozyten bei RT mittels Erythrozyten-Lysepuffer wurde die Reaktion mit FCS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4 °C), und das erhaltene Zellpellet zur Zellzahlbestimmung in 3 ml Medium resuspendiert. Die Knochenmarkszellen wurden anschließend zu myeloiden Zellen differenziert.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Isolation von RNS aus Gewebe

Die aus der mit PBS perfundierten Maus isolierten Organe wurden in ein Eppendorff-Röhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Isolation der RNS wurde das Fluka-Kit (RNA Isolation Kit) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das jeweilige Organ wurde sofort, in noch gefrorenem Zustand, in mindestens 1 ml SolD Lösung aufgenommen (1 ml/g Gewebe). Das Gewebe wurde mittels eines elektrischen Homogenisators (Ultra-Turrax, Tab. 4.1.7) zerkleinert. Die Konzentration der RNS wurde mittels des NanoDrop (Tab 4.1.7) bei 260 nm bestimmt.

Dabei gilt: 1,0 A260= 40 µg RNS/ml

Der Quotient der Wellenlängen 260/280 zeigt die Reinheit der RNS an. Der Quotient sollte bei ca. 2 liegen, um Verunreinigungen durch Proteine und andere organische Komponenten ausschließen zu können.

4.5.2 Reverse Transkription

Während der cDNS Synthese wird mRNA aus Zellen oder Gewebeproben enzymatisch mit Hilfe einer reversen Transkriptase in DNS umgeschrieben. Die molekularen Verhältnisse der Transkripte werden nicht verändert, weshalb die entstehende cDNS zur Expressionsquantifizierung mittels quantitativer Realtime Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) eingesetzt werden kann.

Für die Reverse Transkription wurden 2,5 µg RNS eingesetzt. Zuerst erfolgte ein Verdau mittels DNase I, um Verunreinigungen durch genomische DNS zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C in einem Thermomixer (Tab. 4.1.7) in dem folgenden Reaktionsansatz 1:

2,5 µg RNS

10 U DNase I

ad 5 ml RNase-freiem Wasser

Anschließend wurde die DNase für 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Die Reverse Transkription wurde mittels der Super Script III RT (Tab.) durchgeführt. Der Reaktionsansatz 2 enthielt:

5 µl RNS aus Reaktionsansatz 1

1 µl Oligo(dT)₂₀ (50µM)

1 µl 10 mM dNTP Mix

6 µl RNase freies H₂O

Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, auf Eis gestellt und dem Reaktionsansatz 3 hinzugefügt:

1 µl 0,1M DTT

4 µl 1 x First Strand Buffer

1 µl SuperscriptTM RTase (200U/µl)

1 µl RNase-freies H₂O

Die RT-PCR wurde für 1 h bei 50 °C durchgeführt mit einer anschließenden 15 minütigen Inaktivierung bei 70 °C und Lagerung bei 4 °C. Die so generierte cDNS wurde 1:5 mit ddH₂O verdünnt und 5 µl dieser Verdünnung für die qRT-PCR Analyse eingesetzt.

4.5.3 Quantitative Real Time PCR

Die quantitative Realtime (qRT)-PCR beruht auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und stellt eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren dar. Gleichzeitig bietet sie die Möglichkeit zur Quantifizierung des entstehenden Produktes mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines jeden Zyklus. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Dies geschieht, indem eine Fluoreszenz-markierte Sonde eingesetzt wird, bei der die Fluorophore zuvor gequencht vorliegen. Diese wird während der Polymerisierung abgebaut und die Fluorophore werden freigesetzt. Die relative Genexpression wurde unter Verwendung der Pfaffl-Methode berechnet (Pfaffl et al., 2001). Der folgende Ansatz wurde in der qRT-PCR eingesetzt:

12,5 µl Fast Start Mastermix (Invitrogen)

6,5 µl H₂O

0,3 µl Primer 1

0,3 µl Primer 2

0,5 µl Sonde

5 µl 1:5 verdünnte cDNS

Der Reaktionszyklus wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- | | |
|--|-------------------|
| 1. DNS Denaturierung | 95 °C 7 Minuten |
| 2. DNS Denaturierung | 95 °C 20 Sekunden |
| 3. Primerhybridisierung und Primerverlängerung | 60 °C 1 Minute |
| 4. Lagerung | 4 °C unendlich |

Schritte 2 bis 3 wurden zyklisch 45 Mal wiederholt

Für jedes Primerpaar wurde eine *non template control*, eine DNS-freie Probe als Negativkontrolle mitgeführt. Als Referenzgen für die Quantifizierung der Genexpression wurde β -actin verwendet. Jede Probe wurde in Triplikaten bestimmt.

4.6 Zellbiologische Methoden

4.6.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Zellkultur-behandelten Zellkulturflaschen oder Mehrfach-Loch-Platten. Primäre Zellen wurden hingegen in unbeschichteten (?) Petrischalen kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10 % CO₂. Die Zellkultur wurde an einer Sterilwerkbank unter Verwendung steriler Materialien und Lösungen durchgeführt. Das für die Zellkulturmedien verwendete FCS wurde für 30 min bei 60 °C erwärmt, um die darin enthaltenen Komplementproteine zu inaktivieren.

4.6.2 Kryokonservierung und Lagerung eukaryotischer Zellen

Für die Langzeitkonservierung wurden die abtrypsinierten adhärent wachsenden Zellen bei 1200 rpm, 10 min, RT zentrifugiert, in Einfriermedium resuspendiert und 1 ml in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden über Nacht in Isopropanol-gefüllten Einfriercontainern (Tab. 4.1.7) vorerst bei -80 °C eingefroren und am folgenden Tag in mit flüssigem Stickstoff gefüllte Tanks überführt. Mit dieser Methode wurde die Fibrosarkom-Linie HT1080 eingefroren und aufbewahrt.

4.6.3 Generierung und Austestung von GM-CSF-haltigem Überstand

Zur Generierung eines GM-CSF haltigen Zellkultur-Überstandes wurde die Myelom-Zelllinie P3X63/O-GM-CSF verwendet und in IMDM Medium (ohne GM-CSF-Sup, vgl.) kultiviert. 4-8 x 10⁴ Zellen/ml wurden in 50 ml Medium in eine 162 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Nach 7 Tagen wurde der Kulturüberstand zweimal abzentrifugiert (1. 10 min, 1200 rpm; 2. 30 min 3000 rpm). Die Beurteilung des GM-CSF-haltigen Überstandes erfolgte durch Kultivierung von Knochenmarkszellen in mit unterschiedlichen Konzentrationen an GM-CSF-Sup angereichertem GM-CSF-DC-Medium und folgender TLR-Stimulation. Nach 24 h wurden die Zellen auf den DC-spezifischen Oberflächenmarker CD11c und die Aktivierungsmarker CD86 und I-A^b (MHC Klasse II) hin analysiert.

4.6.4 Generierung von GM-CSF DCs

2-2,5x10⁶ Knochenmarkszellen wurden pro 10 cm unbeschichteter Petrischale in 10 ml GM-CSF-DC Medium ausgesät. Nach 3 Tagen wurden 10 ml frisches Medium supplementiert. An Tag 6 der Kultur erfolgte ein Austausch von 10 ml Kulturüberstand. Der abgenommene Kulturüberstand wurde

abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT) und das Zellpellet mit 10 ml frischem Medium resuspendiert und anschließend zur Zellkultur zurückgegeben. Nach insgesamt 9-10 Tagen waren die Zellen zu unreifen GM-CSF-DCs differenziert. Zur Gewinnung der kultivierten DCs wurden die Zellen 30 min bei 4°C inkubiert und mittels Zellschaber abgekratzt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT) in frischem Medium resuspendiert. Die nachfolgenden Stimmulations-Experimente wurden mit 1×10^6 Zellen durchgeführt.

4.6.5 Generierung von adulter Mikroglia

Zur Generierung von adulter Mikroglia wurden mononukleäre Zellen aus Rückenmark und Gehirn von naiven Mäusen isoliert. Diese wurde wie unter 4.4.2.7 beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und mit einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen in 3 ml Medium pro Loch einer nicht-Zellkultur-beschichteten 6-Loch-Platte ausgesät. Alle 3 d erfolgte ein Mediumwechsel, wobei nur adhärenente Zellen weiterkultiviert wurden. Nach ca. einer Woche fingen die Zellen an zu proliferieren und wurden bei Konfluenz gesplittet und expandiert. Dafür wurde das Medium durch kaltes PBS ersetzt und die Platte bei 4 °C bis zur Abkuglung der Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zellschaber vorsichtig abgekratzt und 1:3 gesplittet und eingesät. Nach 14 d wurden die Zellen mit verschiedenen TLR-Agonisten für 24 h stimuliert und mittels FACS analysiert.

4.6.7 Stimulation von *in vitro* generierten myeloiden Zellen

Die Stimulation von *in vitro* differenzierten myeloiden Zellen mit TLR Agonisten erfolgte mit den unter angegebenen Stimulus-Konzentrationen für jeweils 24 h. Die Agonisten wurden unmittelbar in den Zellkulturüberstand gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Kulturschalen vermischt.

Tabelle 4.9 *In vitro* TLR Stimulation

Agonist	stimulierter PRR	Konzentration
poly(I:C)	TLR3, MDA5	50 µg/ml
LPS (<i>S. minnesota</i>)	TLR4	100 ng/ml
CpG ODNs	TLR9	6 µg/ml
wobble DNS	TLR7	400 ng/ml

4.6.8 *In vitro* Restimulation von sortierten GM-CSF DCs

Zur Charakterisierung der Reporterallel-Expression nach einer Restimulation mit spezifischen TLR-Agonisten wurden GM-CSF DCs aus Doppel-Reportertermäusen für $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ und $\text{IL-12p40}^{\text{get40/get40}}$ nach Protokoll generiert (s. 4.6.6.2). Diese wurden an d 9 der Kultur für 24 h mit poly(I:C) (50 µg/ml) stimuliert und anschließend von geschultem Personal mittels des FACS Aria I auf der Grundlage ihrer CD11c und Reporterallel-Expression in die jeweiligen Populationen sortiert. Die sortierten Populationen wurden gezählt und gleiche Zellzahlen der Populationen wurden in 6-Loch Platten eingesät. Nach einer 36 h Ruhephase und Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen naiv

belassen oder für 24 weitere Stunden mit den jeweils angegebenen TLR-Agonisten stimuliert. Die Reporterallel-Expression der einzelnen Populationen wurde mittels FACS bestimmt.

4.6.9 T Zell Proliferationsassay

Zur Charakterisierung der Funktion der Reporterallel-exprimierenden Populationen als APZs und damit ihrer Fähigkeit T Zell-Proliferation zu stimulieren wurden naive $CD4^+ CD62L^+$ T Zellen aus OTII-transgenen Mäusen aus den Lymphknoten und der Milz isoliert. Die Isolation erfolgte mittels des MACS Aufreinigungs-Kits für naive T Zellen (Tab. 4.1.4) nach Angaben des Herstellers. Als Stimulatorzellen wurden die sortierten DC-Populationen der $IFN\beta^{mob/mob} \times IL-12p40^{get40/get40}$ in Triplikaten mit 2×10^4 Zellen/Loch ausgesät. Diese wurden seriell 1:2 bis zu 1:312 Stimulatorzellen/Loch verdünnt. Als Effektorzellen wurden 2×10^4 naive OT II T Zellen/Loch hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 μ M OVA-Peptid (Tab. 4.1.1) gepulst. Dieser Ansatz wurde in einem 2 fach Ansatz durchgeführt. Für die Proliferationsmessung via Messung der Inkorporation von radioaktivmarkiertem Thymidin, wurde der Ansatz insgesamt 72 h kultiviert, wobei für die letzten 16 h 1 μ Ci $[3H]$ -Thymidin zugegeben wurde. Dieses wird während der Zellteilung in die sich replizierende DNS inkorporiert. Die Stärke der Proliferation wird nach Binden der zellulären DNS an einen Glasfaserfilter und Überschichten mit Szintillationsflüssigkeit im β -Counter direkt bestimmt. Der zweite Ansatz wurde ebenfalls 5 d inkubiert und zur Bestimmung der IL-2 Zytokinkonzentration im Überstand verwendet, die ein direktes Maß für die Proliferation der T Zellen darstellt, da sie IL-2 als Überlebensfaktor selbst produzieren.

4.7 Immunologische Methoden

4.7.1 ELISA

Ein ELISA dient der Quantifizierung von Proteinen in einer Lösung. Dabei wird in der hier verwendeten Methodik des Sandwich-ELISAS ein Antigen durch einen an eine Kunststoffplatte fixierten monoklonalen Antikörper gebunden. Anschließend wird ein zweiter für das Antigen spezifischer, biotinylierter Antikörper hinzugegeben, der durch die Bindung ebenfalls immobilisiert wird. Ein Konjugat aus Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase wird durch das Antikörper-konjugierte Biotin gebunden und die Peroxidase katalysiert eine enzymatische Farbreaktion nach Zugabe des Substrates Tetramethylbenzidine (TMB), welche mit 2 N H_2SO_4 abgestoppt wird. Die Farbintensität steigt proportional mit der gebundenen Antigenmenge an und wird mit einem Mikroplattenleser (Tab. 4.1.6) photometrisch bei 450 nm gemessen. Anhand einer mitgeführten Standardkurve wird die Proteinkonzentration der Proben ermittelt. In dieser Arbeit wurden ELISA für $IFN\beta$, IL-12p40, $TNF\alpha$ und IL-10 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden in Triplikaten gemessen.

4.7.2 Immunhistologie

Nach ihrer Entnahme wurden die Organe für 1 h pro mm Gewebedicke in PFA-Fixierpuffer bei RT fixiert, mit PBS gewaschen und über Nacht in 30 % Saccharose in PBS bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Organe in Einbettmedium eingelegt, in mit Trockeneis gekühltem 2-Methyl-Butan eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Gefrierschnitte wurden in einer Dicke

von 8 µm angefertigt, auf Objektträger aufgebracht und bei -20 °C gelagert. Unmittelbar vor der Färbeprozedur wurden die Schnitte aufgetaut und getrocknet, 2 min in PBS rehydriert und die Organe mit einem Fettstift umrandet. Die weiteren Färbeschritte wurden in einer feuchten Kammer bei RT durchgeführt. Zwischen den Schritten wurden die Schnitte für einige Sekunden in PBS gewaschen. Zunächst wurden die im Gewebe enthaltenen Peroxidasen mittels einer 1 h Inkubation in 1% H₂O₂, 0,1 % NaN₃ in PBS bei RT unter Schwenken inaktiviert, um unspezifischen Hintergrund zu vermeiden. Zusätzlich wurde endogenes Biotin mit einem Avidin/Biotin Blockierkit gebunden. Zuletzt wurden unspezifische Bindestellen blockiert, in dem die Gewebeschnitte für 25 min mit Fc-Block (1:50), 1 % Maus-Normal Serum, 1 % Ratte-Normal Serum, 1 % Esel-Normal Serum in TNB inkubiert. Die Zusammensetzung der Blockierlösung wurde je nach Speziespezifität der verwendeten AK angepasst wurde. Spezifische Primär- und Sekundär-AK wurden in austitrierten Konzentrationen in TNB für 30-60 min inkubiert. Schließlich wurde eine Verstärkung des Signals mittels eines Tyramid-Signalverstärkungs-Kits durchgeführt. Hierzu wurden die Organschnitte nach Inkubation mit einem biotinylierten AK mit Streptavidin (SA) konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP) 1:200 in TNB für 25 min inkubiert. Das Verstärkungsreagenz Tyramid wurde als Biotin- oder FITC Konjugat 1:100 in Verstärkungspuffer verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 6-8 min. Bei Mehrfachfärbungen wurden Peroxidasen mit H₂O₂ und NaN₃ erneut inaktiviert und der Biotin/Avidin Blockierschritt durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit DAPI beinhaltendem Vectashield eingedeckt und mit Nagellack versiegelt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen eines Experimentes wurden mit Adobe Photoshop CS1 in identischer Weise nachbearbeitet und zu einem Gesamtbild zusammengefügt.

4.7.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird auch als FACS (fluorescence activated cell sorting) bezeichnet. Sie stellt ein Messverfahren dar, bei dem die Expression von spezifischen Molekülen auf und in Zellen detektiert werden kann. Damit ist es möglich verschiedene Zellpopulationen eines Organes qualitativ und quantitativ zu beschreiben. Spezifische Antikörper, die mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind, binden an ihre spezifischen Antigene auf der Zellmembran oder intrazellulär nach einer optionalen Permeabilisation. Das Durchflusszytometer regt durch einen Laserstrahl die Emission der fluoreszierenden Signale an, und das emittierte Streulicht wird von Detektoren registriert. Die markierten Zellen passieren einzeln nacheinander mehrere Laserstrahlen und streuen das Laserlicht. Das durch Beugung hervorgerufene Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) stellt ein Maß für die Zellgröße und das durch Brechung hervorgerufene Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) steht für die Granularität der Zelle. Die Detektoren, Photomultiplier (PMT), detektieren jedoch nicht nur das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, sondern auch die Fluoreszenz-Emissionen der an die Zellen gebundenen Antikörper. Die simultane Verwendung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die Charakterisierung mehrerer Zellpopulationen gleichzeitig.

4.7.4 Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmarkern

Für die FACS-Analysen in dieser Arbeit wurden vor allem Zellsuspensionen verschiedener Organe, aber auch primäre Zellkultur-Zellen verwendet. Alle Antikörper wurden im Überschuss eingesetzt. Die Inkubationsschritte erfolgten im Dunkeln auf Eis. Für Milz und Lymphknoten wurden pro Färbung in der Regel ca. 8×10^6 Zellen eingesetzt. Für das Rückenmark und das Gehirn wurden Organe meist mehrerer Mäuse gepoolt, um $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ Zellen analysieren zu können. Für die Analyse von primären Zellkulturen wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt. Für die Markierung des IFN γ R1 wurden nach Angaben des Herstellers 3×10^5 Zellen eingesetzt.

Die Einzelzellsuspension wurde mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend in FACS-Röhrchen durch ein Siebgewebe pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 5 min, 4 °C) wurden zunächst die Fc-Rezeptoren CD16/32 für mindestens 10 Minuten auf Eis blockiert (1:50 in 25 μ l FACS-Puffer). Anschließend wurden die Fluorochrom konjugierten oder biotinylierten Antikörper in 25 μ l FACS-Puffer hinzugegeben und erneut für mindestens 10 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 3-4 ml FACS-Puffer gewaschen und pelletiert (1200 rpm, 5 min, 4 °C). Bei Verwendung von biotinylierten Antikörpern wurden die Proben in einem zweiten Färbeschritt mit 50 μ l Sekundärreagenz, einem Fluorochrom-konjugiertem Streptavidin, für 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert, erneut gewaschen und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4 °C). Abschließend wurden die Zellen in 200 – 500 μ l DAPI enthaltendem FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Die FACS Analyse wurde mit dem FACS Canto II und der FACS Diva Software (BD Biosciences) durchgeführt.

4.7.5 Zellsortierung

Die Zellsortierung erfolgte am BD FACS Aria I mit der FACS Diva Software. Die Zellen im Probenstrahl werden zunächst analysiert. Anschließend wird der Probenstrahl in bis zu 87.000 einzelne Tropfen pro Sekunde eingeteilt und die Zellen werden den Tropfen zugeteilt. Beim Tropfenabriss werden die Tropfen elektrostatisch geladen. Die Zieltröpfchen können dann in bis zu 4 verschiedene Populationen sortiert werden.

4.7.6 Analyse und Darstellung von FACS-Daten

Die generierten FACS-Daten wurden mit Hilfe der FlowJo Software (Tree Star, Ashland, USA) analysiert. Die Zellen können in unterschiedlichen Diagrammen dargestellt werden. In einem Punktediagramm wird jede Zelle zweidimensional in einem Koordinatensystem in Abhängigkeit von ihrer Signalstärke, Größe oder Granularität als Punkt dargestellt. Die hier gezeigten Diagramme (Kontur-Plots) stellen eine hohe Zelldichte durch Höhenlinien dar. Im Histogramm werden die Zellen hinsichtlich ihrer Signalintensität eines einzelnen Parameters analysiert. Durch die Überlagerung einzelner Plots, sowohl Kontur-Plots als auch Histogrammen, werden definierte Populationen bzgl. ihrer Signalstärke direkt mit einander verglichen. Das Setzen von Analysefenstern („Gates“) in

Abhängigkeit der Oberflächenmarker-Expression, die sich in der Signalstärke der Fluorochrome widerspiegelt, erlaubt eine elektronische Selektion („gaten“) von spezifischen Zellpopulationen.

Für die Analyse wurden die hier gezeigten Ergebnisse wie folgt gegatet:

In vitro generierte GM-CSF DCs und Makrophagen: Tote Zellen, die DAPI⁺ waren wurden ausselektiert. Weiterhin wurde auf den zelllinien-definierenden Oberflächenmarker, CD11c für DCs und CD11b für Makrophagen, gegatet.

In vitro generierte adulte Mikroglia: Tote, DAPI⁺ Zellen wurden elektronisch ausgeschlossen und es wurde auf CD45⁺, CD11b⁺ Zellen selektiert.

Ex vivo Analyse von Milz und Lymphknoten: Tote, DAPI⁺ Zellen sowie CD3ε⁺ und CD19⁺ T- und B-Zellen wurden ausgeschlossen.

Ex vivo Analyse von Rückenmark und Gehirn: Tote, DAPI⁺ wurden ausgeschlossen. Weiterhin wurde ggf. auf die Expression von CD45 und CD11b gegatet.

5. Literaturverzeichnis

(1996). Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 47, 889-894.

Abbas, A.K., Litchman, A.H. and Pillai, S. (2007), 6th Edition, Cellular and Molecular Immunology. (Philadelphia, USA, Saunders), Seite 282

Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease* 37, 13-25.

Ärztezeitung (27.06.2007). Interferon-beta-Mittel sind bei MS ähnlich gut wirksam, pp. http://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/neuro-psychiatrische_krankheiten/multiple_sklerose/article/454160/interferon-beta-mittel-ms-aehnlich-wirksam.html.

Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., and Thanos, D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* 103, 667-678.

Aichele, P., Zinke, J., Grode, L., Schwendener, R.A., Kaufmann, S.H., and Seiler, P. (2003). Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J Immunol* 171, 1148-1155.

Airoldi, I., Gri, G., Marshall, J.D., Corcione, A., Facchetti, P., Guglielmino, R., Trinchieri, G., and Pistoia, V. (2000). Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells. *J Immunol* 165, 6880-6888.

Akira, S. (2006). TLR signaling. *Current topics in microbiology and immunology* 311, 1-16.

Aktas, O., Smorodchenko, A., Brocke, S., Infante-Duarte, C., Schulze Topphoff, U., Vogt, J., Prozorovski, T., Meier, S., Osmanova, V., Pohl, E., *et al.* (2005). Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL. *Neuron* 46, 421-432.

Allt, G., and Lawrenson, J.G. (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells, tissues, organs* 169, 1-11.

Aloisi, F., Ria, F., Columba-Cabezas, S., Hess, H., Penna, G., and Adorini, L. (1999). Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4⁺ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *European journal of immunology* 29, 2705-2714.

Andreasen, C., Powell, D.A., and Carbonetti, N.H. (2009). Pertussis toxin stimulates IL-17 production in response to Bordetella pertussis infection in mice. *PLoS one* 4, e7079.

Ank, N., Iversen, M.B., Bartholdy, C., Staeheli, P., Hartmann, R., Jensen, U.B., Dagnaes-Hansen, F., Thomsen, A.R., Chen, Z., Haugen, H., *et al.* (2008). An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *J Immunol* 180, 2474-2485.

- Ank, N., West, H., and Paludan, S.R. (2006). IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 26, 373-379.
- Apostolou, E., and Thanos, D. (2008). Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. *Cell* 134, 85-96.
- Archelos, J.J., Storch, M.K., and Hartung, H.P. (2000). The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 47, 694-706.
- Ardavin, C. (2003). Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nature reviews Immunology* 3, 582-590.
- Ascherio, A., and Munger, K. (2008). Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention. *Seminars in neurology* 28, 17-28.
- Ascherio, A., Munger, K.L., and Lunemann, J.D. (2012). The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nature reviews Neurology* 8, 602-612.
- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Briere, F., *et al.* (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature immunology* 2, 1144-1150.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Chemin, K., Boonstra, A., O'Garra, A., Vicari, A., and Trinchieri, G. (2005). Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *The Journal of experimental medicine* 201, 1157-1167.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J.J., Briere, F., and Trinchieri, G. (2003). Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol* 171, 6466-6477.
- AWMFOonline (2010). Langfassung der Leitlinie "Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis". <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/079-001.html>, letzter Aufruf 7.11.2012
- Axtell, R.C., de Jong, B.A., Boniface, K., van der Voort, L.F., Bhat, R., De Sarno, P., Naves, R., Han, M., Zhong, F., Castellanos, J.G., *et al.* (2010). T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nature medicine* 16, 406-412.
- Ayala, A., Song, G.Y., Chung, C.S., Redmond, K.M., and Chaudry, I.H. (2000). Immune depression in polymicrobial sepsis: the role of necrotic (injured) tissue and endotoxin. *Critical care medicine* 28, 2949-2955.
- Bailey-Bucktrout, S.L., Caulkins, S.C., Goings, G., Fischer, J.A., Dzionek, A., and Miller, S.D. (2008). Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180, 6457-6461.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 18, 767-811.
- Barbalat, R., Ewald, S.E., Mouchess, M.L., and Barton, G.M. (2011). Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annual review of immunology* 29, 185-214.
- Barchet, W., Cella, M., and Colonna, M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Seminars in immunology* 17, 253-261.

- Barker, C.F., and Billingham, R.E. (1977). Immunologically privileged sites. *Advances in immunology* 25, 1-54.
- Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N.M., Danilenko, D.M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F.J., and Ghilardi, N. (2006). Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nature immunology* 7, 929-936.
- Baxter, A.G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature reviews Immunology* 7, 904-912.
- Beadling, C., and Slifka, M.K. (2004). How do viral infections predispose patients to bacterial infections? *Current opinion in infectious diseases* 17, 185-191.
- Becher, B., Durell, B.G., Miga, A.V., Hickey, W.F., and Noelle, R.J. (2001). The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system. *The Journal of experimental medicine* 193, 967-974.
- Becher, B., Durell, B.G., and Noelle, R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *The Journal of clinical investigation* 110, 493-497.
- Becher, B., Durell, B.G., and Noelle, R.J. (2003). IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation* 112, 1186-1191.
- Bernard, C.C., and Carnegie, P.R. (1975). Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: immunologic response to mouse spinal cord and myelin basic proteins. *J Immunol* 114, 1537-1540.
- Beutler, B., and Poltorak, A. (2001). Sepsis and evolution of the innate immune response. *Critical care medicine* 29, S2-6; discussion S6-7.
- Billiau, A., and Matthys, P. (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of leukocyte biology* 70, 849-860.
- Biron, C.A. (1998). Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Seminars in immunology* 10, 383-390.
- Bode, K.A., Schmitz, F., Vargas, L., Heeg, K., and Dalpke, A.H. (2009). Kinetic of RelA activation controls magnitude of TLR-mediated IL-12p40 induction. *J Immunol* 182, 2176-2184.
- Bogdan, C., Mattner, J., and Schleicher, U. (2004). The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunological reviews* 202, 33-48.
- Bone, R.C. (1996). Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Critical care medicine* 24, 1125-1128.
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., and Sibbald, W.J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644-1655.
- Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y.J., and O'Garra, A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *The Journal of experimental medicine* 197, 101-109.

- Bowie, A.G., and Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nature reviews Immunology* 8, 911-922.
- Bowzard, J.B., Davis, W.G., Jeisy-Scott, V., Ranjan, P., Gangappa, S., Fujita, T., and Sambhara, S. (2011). PAMPPer and tRIGer: ligand-induced activation of RIG-I. *Trends in biochemical sciences* 36, 314-319.
- Bsibsi, M., Bajramovic, J.J., Vogt, M.H., van Duijvenvoorden, E., Baghat, A., Persoon-Deen, C., Tielen, F., Verbeek, R., Huitinga, I., Ryffel, B., *et al.* (2010). The microtubule regulator stathmin is an endogenous protein agonist for TLR3. *J Immunol* 184, 6929-6937.
- Buras, J.A., Holzmann, B., and Sitkovsky, M. (2005). Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews Drug discovery* 4, 854-865.
- Calabresi, P.A., Pelfrey, C.M., Tranquill, L.R., Maloni, H., and McFarland, H.F. (1997). VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Neurology* 49, 1111-1116.
- Carlin, J.M., and Weller, J.B. (1995). Potentiation of interferon-mediated inhibition of Chlamydia infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. *Infection and immunity* 63, 1870-1875.
- Carrero, J.A., Calderon, B., and Unanue, E.R. (2004). Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to Listeria infection. *The Journal of experimental medicine* 200, 535-540.
- Carson, M.J., Doose, J.M., Melchior, B., Schmid, C.D., and Ploix, C.C. (2006). CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological reviews* 213, 48-65.
- Carson, M.J., Reilly, C.R., Sutcliffe, J.G., and Lo, D. (1998). Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* 22, 72-85.
- Carson, M.J., Reilly, C.R., Sutcliffe, J.G., and Lo, D. (1999). Disproportionate recruitment of CD8+ T cells into the central nervous system by professional antigen-presenting cells. *The American journal of pathology* 154, 481-494.
- Cassan, C., Piaggio, E., Zappulla, J.P., Mars, L.T., Couturier, N., Bucciarelli, F., Desbois, S., Bauer, J., Gonzalez-Dunia, D., and Liblau, R.S. (2006). Pertussis toxin reduces the number of splenic Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 177, 1552-1560.
- Chan, S.H., Kobayashi, M., Santoli, D., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1992). Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J Immunol* 148, 92-98.
- Chen, X., Winkler-Pickett, R.T., Carbonetti, N.H., Ortaldo, J.R., Oppenheim, J.J., and Howard, O.M. (2006). Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T regulatory cells. *European journal of immunology* 36, 671-680.
- Chi, T. (2004). A BAF-centred view of the immune system. *Nature reviews Immunology* 4, 965-977.
- Chiu, Y.H., Macmillan, J.B., and Chen, Z.J. (2009). RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576-591.

- Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011). ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology* 12, 560-567.
- Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885-891.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566-569.
- Cousens, L.P., Orange, J.S., Su, H.C., and Biron, C.A. (1997). Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 634-639.
- Cousens, L.P., Peterson, R., Hsu, S., Dorner, A., Altman, J.D., Ahmed, R., and Biron, C.A. (1999). Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *The Journal of experimental medicine* 189, 1315-1328.
- Cserr, H.F., and Bundgaard, M. (1984). Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *The American journal of physiology* 246, R277-288.
- Cserr, H.F., and Knopf, P.M. (1992). Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunology today* 13, 507-512.
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.
- Cuzner, M.L., and Opdenakker, G. (1999). Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *Journal of neuroimmunology* 94, 1-14.
- D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S.H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E., *et al.* (1992). Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of experimental medicine* 176, 1387-1398.
- Dal Canto, M.C., Melvold, R.W., Kim, B.S., and Miller, S.D. (1995). Two models of multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection. A pathological and immunological comparison. *Microscopy research and technique* 32, 215-229.
- Dalod, M., Salazar-Mather, T.P., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Briere, F., Trinchieri, G., and Biron, C.A. (2002). Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *The Journal of experimental medicine* 195, 517-528.
- De Groot, C.J., Sminia, T., Dijkstra, C.D., Van der Pal, R.H., and Lopes-Cardozo, M. (1991). Interferon-gamma induced IA antigen expression on cultured neuroglial cells and brain macrophages from rat spinal cord and cerebrum. *The International journal of neuroscience* 59, 53-65.

Decker, T., Muller, M., and Stockinger, S. (2005). The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nature reviews Immunology* 5, 675-687.

Delhaye, S., Paul, S., Blakqori, G., Minet, M., Weber, F., Staeheli, P., and Michiels, T. (2006). Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7835-7840.

Dellinger, R.P., Levy, M.M., Carlet, J.M., Bion, J., Parker, M.M., Jaeschke, R., Reinhart, K., Angus, D.C., Brun-Buisson, C., Beale, R., *et al.* (2008). Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive care medicine* 34, 17-60.

Desmet, C.J., and Ishii, K.J. (2012). Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nature reviews Immunology* 12, 479-491.

Dinarello, C.A. (1997). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112, 321S-329S.

Doughty, L.A., Carlton, S., Galen, B., Cooma-Ramberan, I., Chung, C.S., and Ayala, A. (2006). Activation of common antiviral pathways can potentiate inflammatory responses to septic shock. *Shock* 26, 187-194.

Downer, E.J., Clifford, E., Gran, B., Nel, H.J., Fallon, P.G., and Moynagh, P.N. (2011). Identification of the synthetic cannabinoid R(+)-WIN55,212-2 as a novel regulator of IFN regulatory factor 3 activation and IFN-beta expression: relevance to therapeutic effects in models of multiple sclerosis. *The Journal of biological chemistry* 286, 10316-10328.

Dresing, Philipp: *In vitro* und *in vivo* Charakterisierung von IFN beta exprimierenden Zellen mittels eines bicistronischen Fluoreszenz-Reportermausmodells, Dissertation, 2010, Heinrich-Heine-Universität

Dresing, P., Borkens, S., Kocur, M., Kropp, S., and Scheu, S. (2010). A fluorescence reporter model defines "Tip-DCs" as the cellular source of interferon beta in murine listeriosis. *PLoS one* 5, e15567.

El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.X., Dittel, B.N., and Rostami, A. (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology* 12, 568-575.

Emmanuilidis, K., Weighardt, H., Maier, S., Gerauer, K., Fleischmann, T., Zheng, X.X., Hancock, W.W., Holzmann, B., and Heidecke, C.D. (2001). Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis. *J Immunol* 167, 3919-3927.

Engel, C., Brunkhorst, F.M., Bone, H.G., Brunkhorst, R., Gerlach, H., Grond, S., Gruendling, M., Huhle, G., Jaschinski, U., John, S., *et al.* (2007). Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive care medicine* 33, 606-618.

Entleutner, M., Traeger, T., Westerholt, A., Holzmann, B., Stier, A., Pfeffer, K., Maier, S., and Heidecke, C.D. (2006). Impact of interleukin-12, oxidative burst, and iNOS on the survival of murine fecal peritonitis. *International journal of colorectal disease* 21, 64-70.

Erlandsson, L., Blumenthal, R., Eloranta, M.L., Engel, H., Alm, G., Weiss, S., and Leanderson, T. (1998). Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Current biology : CB* 8, 223-226.

- Esposito, F., Radaelli, M., Martinelli, V., Sormani, M.P., Martinelli Boneschi, F., Moiola, L., Rocca, M.A., Rodegher, M., and Comi, G. (2010). Comparative study of mitoxantrone efficacy profile in patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* *16*, 1490-1499.
- Fang, T.C., Schaefer, U., Mecklenbrauker, I., Stienen, A., Dewell, S., Chen, M.S., Rioja, I., Parravicini, V., Prinjha, R.K., Chandwani, R., *et al.* (2012). Histone H3 lysine 9 di-methylation as an epigenetic signature of the interferon response. *The Journal of experimental medicine* *209*, 661-669.
- Feterowski, C., Weighardt, H., Emmanuilidis, K., Hartung, T., and Holzmann, B. (2001). Immune protection against septic peritonitis in endotoxin-primed mice is related to reduced neutrophil apoptosis. *European journal of immunology* *31*, 1268-1277.
- Fink, M.P., and Heard, S.O. (1990). Laboratory models of sepsis and septic shock. *The Journal of surgical research* *49*, 186-196.
- Flohe, S.B., Agrawal, H., Schmitz, D., Gertz, M., Flohe, S., and Schade, F.U. (2006). Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *Journal of leukocyte biology* *79*, 473-481.
- Flugel, A., Schwaiger, F.W., Neumann, H., Medana, I., Willem, M., Wekerle, H., Kreutzberg, G.W., and Graeber, M.B. (2000). Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol* *10*, 353-364.
- Ford, C.C., Johnson, K.P., Lisak, R.P., Panitch, H.S., Shifronis, G., and Wolinsky, J.S. (2006). A prospective open-label study of glatiramer acetate: over a decade of continuous use in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* *12*, 309-320.
- Foster, S.L., Hargreaves, D.C., and Medzhitov, R. (2007). Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* *447*, 972-978.
- Frahm, J. (2007). Magnetresonanz-Tomografie in der Neurobiologie – von Maus bis Mensch. www.mpibpc.mpg.de/327465/research_report_333513, letzter Aufruf 7.11.2012
- Freund, J., and Opie, E.L. (1938). Sensitization and Antibody Formation with Increased Resistance to Tuberculous Infection Induced by Heat Killed Tubercle Bacilli. *The Journal of experimental medicine* *68*, 273-298.
- Fu, X.Y., Kessler, D.S., Veals, S.A., Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (1990). ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 8555-8559.
- Gale, C.R., and Martyn, C.N. (1995). Migrant studies in multiple sclerosis. *Progress in neurobiology* *47*, 425-448.
- Gambuzza, M., Licata, N., Palella, E., Celi, D., Foti Cuzzola, V., Italiano, D., Marino, S., and Bramanti, P. (2011). Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics for multiple sclerosis management. *Journal of neuroimmunology* *239*, 1-12.
- Gao, J.J., Filla, M.B., Fultz, M.J., Vogel, S.N., Russell, S.W., and Murphy, W.J. (1998). Autocrine/paracrine IFN- α mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 α in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 α in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Immunol* *161*, 4803-4810.

- Garber, K. (2008). Infections cast cloud over Novartis' MS therapy. *Nature biotechnology* 26, 844-845.
- Garden, G.A., and Moller, T. (2006). Microglia biology in health and disease. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 1, 127-137.
- Gautier, G., Humbert, M., Deauvieau, F., Scullier, M., Hiscott, J., Bates, E.E., Trinchieri, G., Caux, C., and Garrone, P. (2005). A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 201, 1435-1446.
- Geiss, G., Jin, G., Guo, J., Bumgarner, R., Katze, M.G., and Sen, G.C. (2001). A comprehensive view of regulation of gene expression by double-stranded RNA-mediated cell signaling. *The Journal of biological chemistry* 276, 30178-30182.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., *et al.* (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845.
- Gold, R., Hartung, H.P., and Toyka, K.V. (2000). Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Molecular medicine today* 6, 88-91.
- Gold, R., Linington, C., and Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain : a journal of neurology* 129, 1953-1971.
- Gordon, L.B., Nolan, S.C., Ksander, B.R., Knopf, P.M., and Harling-Berg, C.J. (1998). Normal cerebrospinal fluid suppresses the in vitro development of cytotoxic T cells: role of the brain microenvironment in CNS immune regulation. *Journal of neuroimmunology* 88, 77-84.
- Goriely, S., Neurath, M.F., and Goldman, M. (2008). How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. *Nature reviews Immunology* 8, 81-86.
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature reviews Immunology* 9, 393-407.
- Grasselli, G., Rossi, S., Musella, A., Gentile, A., Loizzo, S., Muzio, L., Di Sanza, C., Errico, F., Musumeci, G., Haji, N., *et al.* (2012). Abnormal NMDA receptor function exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *British journal of pharmacology*.
- Gratz, N., Hartweg, H., Matt, U., Kratochvill, F., Janos, M., Sigel, S., Drobits, B., Li, X.D., Knapp, S., and Kovarik, P. (2011). Type I interferon production induced by *Streptococcus pyogenes*-derived nucleic acids is required for host protection. *PLoS pathogens* 7, e1001345.
- Gregoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., and Walzer, T. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunological reviews* 220, 169-182.
- Greter, M., Heppner, F.L., Lemos, M.P., Odermatt, B.M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R.J., and Becher, B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature medicine* 11, 328-334.
- Grogan, J.L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D.A., Sedat, J.W., and Locksley, R.M. (2001). Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 14, 205-215.

- Grohmann, U., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Orabona, C., Ayroldi, E., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (1998). IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity* 9, 315-323.
- Guilliams, M., Henri, S., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M., and Malissen, B. (2010). From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *European journal of immunology* 40, 2089-2094.
- Guo, J., Peters, K.L., and Sen, G.C. (2000). Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded RNA, or virus infection. *Virology* 267, 209-219.
- Hafler, D.A. (2004). Multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 113, 788-794.
- Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12501-12504.
- Hemmer, B., Archelos, J.J., and Hartung, H.P. (2002). New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature reviews Neuroscience* 3, 291-301.
- Hensler, T., Heidecke, C.D., Hecker, H., Heeg, K., Bartels, H., Zantl, N., Wagner, H., Siewert, J.R., and Holzmann, B. (1998). Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production. *J Immunol* 161, 2655-2659.
- Hickey, W.F. (2001). Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36, 118-124.
- Hoffjan, S., and Akkad, D.A. (2010). The genetics of multiple sclerosis: an update 2010. *Molecular and cellular probes* 24, 237-243.
- Hofstetter, H.H., Sewell, D.L., Liu, F., Sandor, M., Forsthuber, T., Lehmann, P.V., and Fabry, Z. (2003). Autoreactive T cells promote post-traumatic healing in the central nervous system. *Journal of neuroimmunology* 134, 25-34.
- Hotchkiss, R.S., Coopersmith, C.M., McDunn, J.E., and Ferguson, T.A. (2009). The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nature medicine* 15, 496-497.
- Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Swanson, P.E., Schmiege, R.E., Jr., Hui, J.J., Chang, K.C., Osborne, D.F., Freeman, B.D., Cobb, J.P., Buchman, T.G., *et al.* (2001). Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166, 6952-6963.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.
- Huang, L.Y., Reis e Sousa, C., Itoh, Y., Inman, J., and Scott, D.E. (2001). IL-12 induction by a TH1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10. *J Immunol* 167, 1423-1430.
- Hughes, V. (2012). Microglia: The constant gardeners. *Nature* 485, 570-572.
- Hunter, C.A. (2005). New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nature reviews Immunology* 5, 521-531.

Huys, L., Van Hauwermeiren, F., Dejager, L., Dejonckheere, E., Lienenklaus, S., Weiss, S., Leclercq, G., and Libert, C. (2009). Type I interferon drives tumor necrosis factor-induced lethal shock. *The Journal of experimental medicine* 206, 1873-1882.

Hwang, S.Y., Hertzog, P.J., Holland, K.A., Sumarsono, S.H., Tymms, M.J., Hamilton, J.A., Whitty, G., Bertoncello, I., and Kola, I. (1995). A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11284-11288.

Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267.

Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2003). Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature immunology* 4, 733-739.

Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20, 197-216.

Kabat, E.A., Wolf, A., and Bezer, A.E. (1947). The Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Heterologous and Homologous Brain Tissue with Adjuvants. *The Journal of experimental medicine* 85, 117-130.

Kabat, E.A., Wolf, A., Bezer, A.E., and Murray, J.P. (1951). Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *The Journal of experimental medicine* 93, 615-633.

Kappos, L., Weinshenker, B., Pozzilli, C., Thompson, A.J., Dahlke, F., Beckmann, K., Polman, C., and McFarland, H. (2004). Interferon beta-1b in secondary progressive MS: a combined analysis of the two trials. *Neurology* 63, 1779-1787.

Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of experimental medicine* 205, 1601-1610.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 11, 373-384.

Kelley, K.A., Kozak, C.A., Dandoy, F., Sor, F., Skup, D., Windass, J.D., DeMaeyer-Guignard, J., Pitha, P.M., and DeMaeyer, E. (1983). Mapping of murine interferon-alpha genes to chromosome 4. *Gene* 26, 181-188.

Kelly-Scumpia, K.M., Scumpia, P.O., Delano, M.J., Weinstein, J.S., Cuenca, A.G., Wynn, J.L., and Moldawer, L.L. (2010). Type I interferon signaling in hematopoietic cells is required for survival in mouse polymicrobial sepsis by regulating CXCL10. *The Journal of experimental medicine* 207, 319-326.

Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews* 91, 461-553.

Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., and Beyer, C. (2009). The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta neuropathologica* 118, 723-736.

- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 170, 827-845.
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Backstrom, B.T., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Strom, T.B., *et al.* (2007). Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature medicine* 13, 423-431.
- Langrish, C.L., McKenzie, B.S., Wilson, N.J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2004). IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological reviews* 202, 96-105.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170.
- Lehnardt, S., Lachance, C., Patrizi, S., Lefebvre, S., Follett, P.L., Jensen, F.E., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., and Vartanian, T. (2002). The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 2478-2486.
- Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F.E., Ratan, R., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., and Vartanian, T. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8514-8519.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Leung, S., Qureshi, S.A., Kerr, I.M., Darnell, J.E., Jr., and Stark, G.R. (1995). Role of STAT2 in the alpha interferon signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 15, 1312-1317.
- Leung, W.C., and Hashimoto, K. (1986). Modification of susceptibility to *Klebsiella pneumoniae* during murine cytomegalovirus infection. *Microbiology and immunology* 30, 761-776.
- Levi, M., and Ten Cate, H. (1999). Disseminated intravascular coagulation. *The New England journal of medicine* 341, 586-592.
- Lipton, M.M., and Freund, J. (1953). The transfer of experimental allergic encephalomyelitis in the rat by means of parabiosis. *J Immunol* 71, 380-384.
- Loo, Y.M., and Gale, M., Jr. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34, 680-692.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 198, 513-520.
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5598-5603.

- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., and O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* *154*, 5071-5079.
- Maehlen, J., Olsson, T., Zachau, A., Klareskog, L., and Kristensson, K. (1989). Local enhancement of major histocompatibility complex (MHC) class I and II expression and cell infiltration in experimental allergic encephalomyelitis around axotomized motor neurons. *Journal of neuroimmunology* *23*, 125-132.
- Maier, S., Traeger, T., Entleutner, M., Westerholt, A., Kleist, B., Huser, N., Holzmann, B., Stier, A., Pfeffer, K., and Heidecke, C.D. (2004). Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* *21*, 505-511.
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., and Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *The Journal of experimental medicine* *177*, 1199-1204.
- Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* *427*, 355-360.
- Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature reviews Immunology* *5*, 606-616.
- Medawar, P.B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British journal of experimental pathology* *29*, 58-69.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.
- Miller, D.H., Khan, O.A., Sheremata, W.A., Blumhardt, L.D., Rice, G.P., Libonati, M.A., Willmer-Hulme, A.J., Dalton, C.M., Miszkiel, K.A., and O'Connor, P.W. (2003). A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* *348*, 15-23.
- Molesworth-Kenyon, S.J., Oakes, J.E., and Lausch, R.N. (2005). A novel role for neutrophils as a source of T cell-recruiting chemokines IP-10 and Mig during the DTH response to HSV-1 antigen. *Journal of leukocyte biology* *77*, 552-559.
- Moreau, T., and Confavreux, C. (2000). [Can the prognosis of multiple sclerosis be predicted?]. *Pathologie-biologie* *48*, 132-138.
- Morgan, I.M. (1947). Allergic Encephalomyelitis in Monkeys in Response to Injection of Normal Monkey Nervous Tissue. *The Journal of experimental medicine* *85*, 131-140.
- Morrison, L.A. (2004). The Toll of herpes simplex virus infection. *Trends in microbiology* *12*, 353-356.
- Moss, M., and Martin, G.S. (2004). A global perspective on the epidemiology of sepsis. *Intensive care medicine* *30*, 527-529.
- Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., and Cua, D.J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* *198*, 1951-1957.

- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology* 20, 87-90.
- Nansen, A., Christensen, J.P., Marker, O., and Thomsen, A.R. (1997). Sensitization to lipopolysaccharide in mice with asymptomatic viral infection: role of T cell-dependent production of interferon-gamma. *The Journal of infectious diseases* 176, 151-157.
- Nansen, A., and Randrup Thomsen, A. (2001). Viral infection causes rapid sensitization to lipopolysaccharide: central role of IFN-alpha beta. *J Immunol* 166, 982-988.
- Navarini, A.A., Recher, M., Lang, K.S., Georgiev, P., Meury, S., Bergthaler, A., Flatz, L., Bille, J., Landmann, R., Odermatt, B., *et al.* (2006). Increased susceptibility to bacterial superinfection as a consequence of innate antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 15535-15539.
- Negishi, H., Yanai, H., Nakajima, A., Koshiba, R., Atarashi, K., Matsuda, A., Matsuki, K., Miki, S., Doi, T., Aderem, A., *et al.* (2012). Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nature immunology* 13, 659-666.
- Nelissen, I., Ronsse, I., Van Damme, J., and Opendakker, G. (2002). Regulation of gelatinase B in human monocytic and endothelial cells by PECAM-1 ligation and its modulation by interferon-beta. *Journal of leukocyte biology* 71, 89-98.
- Neuhaus, O., Kieseier, B.C., and Hartung, H.P. (2006). Mitoxantrone in multiple sclerosis. *Advances in neurology* 98, 293-302.
- Niedbala, W., Wei, X.Q., Cai, B., Hueber, A.J., Leung, B.P., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2007). IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *European journal of immunology* 37, 3021-3029.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., and Weinshenker, B.G. (2000). Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 343, 938-952.
- O'Brien, K., Fitzgerald, D., Rostami, A., and Gran, B. (2010). The TLR7 agonist, imiquimod, increases IFN-beta production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 221, 107-111.
- Oberholzer, A., Oberholzer, C., Bahjat, K.S., Ungaro, R., Tannahill, C.L., Murday, M., Bahjat, F.R., Abouhamze, Z., Tsai, V., LaFace, D., *et al.* (2002). Increased survival in sepsis by in vivo adenovirus-induced expression of IL-10 in dendritic cells. *J Immunol* 168, 3412-3418.
- Odoardi, F., Sie, C., Strey, K., Ulaganathan, V.K., Schlager, C., Lodygin, D., Heckelsmiller, K., Nietfeld, W., Ellwart, J., Klinkert, W.E., *et al.* (2012). T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. *Nature* 488, 675-679.
- Oldenburg, M., Kruger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., *et al.* (2012). TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* 337, 1111-1115.

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

Olson, J.K., and Miller, S.D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173, 3916-3924.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., *et al.* (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725.

Owens, T., Wekerle, H., and Antel, J. (2001). Genetic models for CNS inflammation. *Nature medicine* 7, 161-166.

Owerbach, D., Rutter, W.J., Shows, T.B., Gray, P., Goeddel, D.V., and Lawn, R.M. (1981). Leukocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 3123-3127.

Paintlia, M.K., Paintlia, A.S., Singh, A.K., and Singh, I. (2011). Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *Journal of neurochemistry* 116, 508-521.

Panitch, H.S. (1995). Early treatment trials with interferon beta in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1 *Suppl 1*, S17-21.

Paterson, P.Y. (1960). Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *The Journal of experimental medicine* 111, 119-136.

Paty, D.W., and Li, D.K. (1993). Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 43, 662-667.

Perl, T.M., Dvorak, L., Hwang, T., and Wenzel, R.P. (1995). Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 274, 338-345.

Perry, H. V., Gordon, S. 1997 *Macrophages and Microglia aus Immunology of the Nervous System*, (New York, Oxford University Press), Seiten 157-159

Pflanz, S., Timans, J.C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., *et al.* (2002). IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16, 779-790.

Piddlesden, S.J., and Morgan, B.P. (1993). Killing of rat glial cells by complement: deficiency of the rat analogue of CD59 is the cause of oligodendrocyte susceptibility to lysis. *Journal of neuroimmunology* 48, 169-175.

Ponomarev, E.D., Novikova, M., Maresz, K., Shriver, L.P., and Dittel, B.N. (2005). Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state. *Journal of immunological methods* 300, 32-46.

Prehaud, C., Megret, F., Lafage, M., and Lafon, M. (2005). Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *Journal of virology* 79, 12893-12904.

- Presky, D.H., Yang, H., Minetti, L.J., Chua, A.O., Nabavi, N., Wu, C.Y., Gately, M.K., and Gubler, U. (1996). A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14002-14007.
- Prinz, M., Garbe, F., Schmidt, H., Mildner, A., Gutcher, I., Wolter, K., Piesche, M., Schroers, R., Weiss, E., Kirschning, C.J., *et al.* (2006). Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 116, 456-464.
- Prinz, M., Schmidt, H., Mildner, A., Knobloch, K.P., Hanisch, U.K., Raasch, J., Merkler, D., Detje, C., Gutcher, I., Mages, J., *et al.* (2008). Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 28, 675-686.
- Puoti, M., Babudieri, S., Rezza, G., Viale, P., Antonini, M.G., Maida, I., Rossi, S., Zanini, B., Putzolu, V., Fenu, L., *et al.* (2004). Use of pegylated interferons is associated with an increased incidence of infections during combination treatment of chronic hepatitis C: a side effect of pegylation? *Antiviral therapy* 9, 627-630.
- Quartin, A.A., Schein, R.M., Kett, D.H., and Peduzzi, P.N. (1997). Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 277, 1058-1063.
- Racke, M.K., and Drew, P.D. (2009). Toll-like receptors in multiple sclerosis. *Current topics in microbiology and immunology* 336, 155-168.
- Ransohoff, R.M., and Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature reviews Immunology* 12, 623-635.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., and Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature immunology* 10, 514-523.
- Reinhardt, R.L., Hong, S., Kang, S.J., Wang, Z.E., and Locksley, R.M. (2006). Visualization of IL-12/23p40 in vivo reveals immunostimulatory dendritic cell migrants that promote Th1 differentiation. *J Immunol* 177, 1618-1627.
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Schariton-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., and Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *The Journal of experimental medicine* 186, 1819-1829.
- Reis e Sousa, C., Sher, A., and Kaye, P. (1999). The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Current opinion in immunology* 11, 392-399.
- Riedemann, N.C., Guo, R.F., and Ward, P.A. (2003). The enigma of sepsis. *The Journal of clinical investigation* 112, 460-467.
- Riken Research, F. (17 August 2007 (Volume 2 Issue 8)). Elucidating the mechanism behind immunity using dendritic cells, pp. <http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/frontline/5028>, letztes Abrufdatum 7.11.2012.

Robertson, J.M., Jensen, P.E., and Evavold, B.D. (2000). DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J Immunol* *164*, 4706-4712.

Saijo, K., and Glass, C.K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature reviews Immunology* *11*, 775-787.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* *155*, 1151-1164.

Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S., and Takeuchi, O. (2010). LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 1512-1517.

Scheu, S., Dresing, P., and Locksley, R.M. (2008). Visualization of IFN β production by plasmacytoid versus conventional dendritic cells under specific stimulation conditions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 20416-20421.

Schmid, C.D., Sautkulis, L.N., Danielson, P.E., Cooper, J., Hasel, K.W., Hilbush, B.S., Sutcliffe, J.G., and Carson, M.J. (2002). Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *Journal of neurochemistry* *83*, 1309-1320.

Schneider-Schaulies, S., Niewiesk, S., Schneider-Schaulies, J., and ter Meulen, V. (2001). Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Current molecular medicine* *1*, 163-181.

Schwartzman, R.J., Simpkins, N., Alexander, G.M., Reichenberger, E., Ward, K., Lindenberg, N., Topolsky, D., and Crilley, P. (2009). High-dose cyclophosphamide in the treatment of multiple sclerosis. *CNS neuroscience & therapeutics* *15*, 118-127.

Schwentker, F.F., and Rivers, T.M. (1934). The Antibody Response of Rabbits to Injections of Emulsions and Extracts of Homologous Brain. *The Journal of experimental medicine* *60*, 559-574.

Sedgwick, J.D., Ford, A.L., Foulcher, E., and Airriess, R. (1998). Central nervous system microglial cell activation and proliferation follows direct interaction with tissue-infiltrating T cell blasts. *J Immunol* *160*, 5320-5330.

Sedgwick, J.D., Schwender, S., Imrich, H., Dorries, R., Butcher, G.W., and ter Meulen, V. (1991). Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *88*, 7438-7442.

Shen, F.W., Saga, Y., Litman, G., Freeman, G., Tung, J.S., Cantor, H., and Boyse, E.A. (1985). Cloning of Ly-5 cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *82*, 7360-7363.

Slifka, M.K., Homann, D., Tishon, A., Pagarigan, R., and Oldstone, M.B. (2003). Measles virus infection results in suppression of both innate and adaptive immune responses to secondary bacterial infection. *The Journal of clinical investigation* *111*, 805-810.

Soldan, S.S., Berti, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L., Calabresi, P.A., Brennan, M.B., Maloni, H.W., McFarland, H.F., Lin, H.C., *et al.* (1997). Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with

multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nature medicine* 3, 1394-1397.

Sorensen, P.S. (2012). Effects of neutralizing antibodies to interferon beta in multiple sclerosis: a logical paradox. *Mult Scler* 18, 131-132.

Sriram, S., Stratton, C.W., Yao, S., Tharp, A., Ding, L., Bannan, J.D., and Mitchell, W.M. (1999). Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 46, 6-14.

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. *The Journal of experimental medicine* 137, 1142-1162.

Stockinger, S., Materna, T., Stoiber, D., Bayr, L., Steinborn, R., Kolbe, T., Unger, H., Chakraborty, T., Levy, D.E., Muller, M., *et al.* (2002). Production of type I IFN sensitizes macrophages to cell death induced by *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 169, 6522-6529.

Stuart, G., and Krikorian, K.S. (1933). Neuroparalytic Accidents Complicating Antirabic Treatment. *British medical journal* 1, 501-504.

Su, Y., and Sinko, P.J. (2006). Drug delivery across the blood-brain barrier: why is it difficult? how to measure and improve it? *Expert opinion on drug delivery* 3, 419-435.

Sugamura, K., Ishii, N., and Weinberg, A.D. (2004). Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nature reviews Immunology* 4, 420-431.

Sugisaki, K., Dannenberg, A.M., Jr., Abe, Y., Tsuruta, J., Su, W.J., Said, W., Feng, L., Yoshimura, T., Converse, P.J., and Mounts, P. (1998). Nonspecific and immune-specific up-regulation of cytokines in rabbit dermal tuberculous (BCG) lesions. *Journal of leukocyte biology* 63, 440-450.

Sweeney, C.M., Lonergan, R., Basdeo, S.A., Kinsella, K., Dungan, L.S., Higgins, S.C., Kelly, P.J., Costelloe, L., Tubridy, N., Mills, K.H., *et al.* (2011). IL-27 mediates the response to IFN-beta therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain, behavior, and immunity* 25, 1170-1181.

Teige, I., Treschow, A., Teige, A., Mattsson, R., Navikas, V., Leanderson, T., Holmdahl, R., and Issazadeh-Navikas, S. (2003). IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 170, 4776-4784.

Terenzi, F., White, C., Pal, S., Williams, B.R., and Sen, G.C. (2007). Tissue-specific and inducer-specific differential induction of ISG56 and ISG54 in mice. *Journal of virology* 81, 8656-8665.

Thanos, D., and Maniatis, T. (1995). Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 83, 1091-1100.

Tian, X., Xu, F., Lung, W.Y., Meyerson, C., Ghaffari, A.A., Cheng, G., and Deng, J.C. (2012). Poly I:C enhances susceptibility to secondary pulmonary infections by gram-positive bacteria. *PLoS one* 7, e41879.

Tienari, P.J. (1994). Multiple sclerosis: multiple etiologies, multiple genes? *Annals of medicine* 26, 259-269.

Touil, T., Fitzgerald, D., Zhang, G.X., Rostami, A., and Gran, B. (2006). Cutting Edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN-beta. *J Immunol* *177*, 7505-7509.

Town, T., Jeng, D., Alexopoulou, L., Tan, J., and Flavell, R.A. (2006). Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3. *J Immunol* *176*, 3804-3812.

Tsunoda, I., and Fujinami, R.S. (2010). Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* *5*, 355-369.

Tuohy, V.K., Yu, M., Yin, L., Mathisen, P.M., Johnson, J.M., and Kawczak, J.A. (2000). Modulation of the IL-10/IL-12 cytokine circuit by interferon-beta inhibits the development of epitope spreading and disease progression in murine autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* *111*, 55-63.

Weighardt, H., Feterowski, C., Veit, M., Rump, M., Wagner, H., and Holzmann, B. (2000a). Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J Immunol* *165*, 4537-4543.

Weighardt, H., Heidecke, C.D., Emmanuilidis, K., Maier, S., Bartels, H., Siewert, J.R., and Holzmann, B. (2000b). Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. *Surgery* *127*, 309-315.

Weighardt, H., Heidecke, C.D., Westerholt, A., Emmanuilidis, K., Maier, S., Veit, M., Gerauer, K., Matevossian, E., Ulm, K., Siewert, J.R., *et al.* (2002). Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. *Annals of surgery* *235*, 560-567.

Weighardt, H., Kaiser-Moore, S., Schlautkotter, S., Rossmann-Bloeck, T., Schleicher, U., Bogdan, C., and Holzmann, B. (2006). Type I IFN modulates host defense and late hyperinflammation in septic peritonitis. *J Immunol* *177*, 5623-5630.

Wekerle, H. (1993). Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease. *Current opinion in neurobiology* *3*, 779-784.

Wen, H., Dou, Y., Hogaboam, C.M., and Kunkel, S.L. (2008). Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. *Blood* *111*, 1797-1804.

Wen, H., Hogaboam, C.M., Gauldie, J., and Kunkel, S.L. (2006). Severe sepsis exacerbates cell-mediated immunity in the lung due to an altered dendritic cell cytokine profile. *The American journal of pathology* *168*, 1940-1950.

West, A.P., Koblansky, A.A., and Ghosh, S. (2006). Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annual review of cell and developmental biology* *22*, 409-437.

Wichterman, K.A., Baue, A.E., and Chaudry, I.H. (1980). Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *The Journal of surgical research* *29*, 189-201.

Wiesemann, E., Deb, M., Trebst, C., Hemmer, B., Stangel, M., and Windhagen, A. (2008). Effects of interferon-beta on co-signaling molecules: upregulation of CD40, CD86 and PD-L2 on monocytes in

relation to clinical response to interferon-beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* *14*, 166-176.

Wilmanski, J.M., Petnicki-Ocwieja, T., and Kobayashi, K.S. (2008). NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *Journal of leukocyte biology* *83*, 13-30.

Wolf, S.A., Fisher, J., Bechmann, I., Steiner, B., Kwidzinski, E., and Nitsch, R. (2002). Neuroprotection by T-cells depends on their subtype and activation state. *Journal of neuroimmunology* *133*, 72-80.

Wolf, S.F., Temple, P.A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R.M., *et al.* (1991). Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* *146*, 3074-3081.

Y

ang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W., and Oppenheim, J.J. (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in immunology* *23*, 291-296.

Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C.J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., Bauer, S., Hochrein, H., and Wagner, H. (2005). Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* *174*, 6129-6136.

Yednock, T.A., Cannon, C., Fritz, L.C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., and Karin, N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* *356*, 63-66.

Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y., and Shimizu, T. (1997). A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature* *387*, 620-624.

Yousry, T.A., Major, E.O., Ryschkewitsch, C., Fahle, G., Fischer, S., Hou, J., Curfman, B., Miszkiel, K., Mueller-Lenke, N., Sanchez, E., *et al.* (2006). Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *The New England journal of medicine* *354*, 924-933.

Zantl, N., Uebe, A., Neumann, B., Wagner, H., Siewert, J.R., Holzmann, B., Heidecke, C.D., and Pfeffer, K. (1998). Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infection and immunity* *66*, 2300-2309.

Zhang, L., Yuan, S., Cheng, G., and Guo, B. (2011). Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. *PLoS one* *6*, e28432.

Zhao, M., Zhang, J., Phatnani, H., Scheu, S., and Maniatis, T. (2012). Stochastic expression of the interferon-beta gene. *PLoS biology* *10*, e1001249

6. Anhang

6.1 Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die mir mit Rat und Tat beim Anfertigen dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefanie Scheu für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit, die stete wissenschaftliche und kulturelle Förderung sowie die große Freiheit zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann danke ich für die freundliche Betreuung und die Übernahme des Gutachtens seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene anfertigen zu dürfen.

Bei meinen Mentoren Dr. Judith Alferink und PD Dr. Albert Zimmermann möchte ich mich für die konstruktiven Gespräche und Ideen bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch PD Dr. Heike Weighardt.

Vielen Dank an Dr. Michael Gliem für die Durchführung der intrathekalen Stimulation und an PD Dr. Philipp Lang für die Bereitstellung der kongenen Mauslinie CD45.1.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meiner Arbeitsgruppe Ann-Kathrin, Jens, Philipp, Regine, Sonja und Steffi für die kontinuierliche Unterstützung, eine tolle Atmosphäre und einfach eine schöne Zeit; ganz besonders bei Sonja für die enthusiastische Hilfe zu jeder Zeit und Jens und Philipp für die zahlreichen Stunden am Sorter; und Sebastian.

Danke auch an alle anderen Institutsmitglieder für die produktive Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich meiner Familie für Rückhalt, Geduld und Unterstützung danken.

6.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde weder in der vorgelegten noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den 14.11.2012

(Magdalena Julia Kocur)