

Effekt von GM-CSF auf  
Dendritische Zellen im ZNS:  
Charakterisierung *in vitro* und *in vivo*

**Inaugural Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Anne-Kathrin Mausberg**

aus Bonn

Düsseldorf

2009



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

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Klaus Dieter Pfeffer

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2009

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Mausberg et al. 2009. Intracerebral Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Induces Functionally Competent Dendritic Cells in the Mouse Brain. *Glia*. im Druck

Diese Arbeit wurde durch das Graduiertenkolleg 320 „Pathologische Prozesse des Nervensystems – Vom Gen zum Verhalten“ gefördert.

## Inhaltsverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis -----	IV
<b>I Einleitung -----</b>	<b>1</b>
<b>1 Immunantworten im Zentralen Nervensystem -----</b>	<b>1</b>
1.1 Das ZNS als immunprivilegiertes Organ -----	2
1.1.1 Blut-Hirn-Schranke -----	2
1.1.2 Verbindungen des ZNS zum lymphatischen System -----	3
1.1.3 Immunsuppressive Umgebung im ZNS -----	4
1.1.4 Abwesenheit von APC im ZNS -----	5
1.2 Migration in das ZNS: Immunreaktion -----	5
1.3 Mikroglia im ZNS -----	7
<b>2 Dendritische Zellen -----</b>	<b>8</b>
2.1 Subpopulationen von DC -----	9
2.2 DC im ZNS -----	11
<b>3 Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF)-----</b>	<b>12</b>
3.1 Die Bedeutung von GM-CSF für DC -----	14
3.2 Die Bedeutung von GM-CSF für Mikroglia -----	14
3.3 GM-CSF unter inflammatorischen Bedingungen -----	15
<b>4 Zielsetzung der Arbeit-----</b>	<b>17</b>
<b>II Ergebnisse -----</b>	<b>19</b>
<b>1 Effekt von GM-CSF auf Mikroglia <i>in vitro</i>-----</b>	<b>19</b>
1.1 Charakterisierung von BALB/c Mikroglia -----	19
1.2 Charakterisierung von C57BL/6 Mikroglia -----	22
1.3 Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften von C57BL/6 Mikroglia -----	30
<b>2 Effekt von GM-CSF auf ZNS-DC <i>in vivo</i> -----</b>	<b>37</b>
2.1 Charakterisierung der Zellpopulationen -----	40
2.2 Immunhistologische Untersuchung -----	45
2.3 Funktionelle Charakterisierung der DC im ZNS -----	51
<b>III Diskussion -----</b>	<b>53</b>
1.1 Einfluss von GM-CSF auf BALB/c Mikroglia <i>in vitro</i> -----	53
1.2 Einfluss von GM-CSF auf C57BL/6 Mikroglia <i>in vitro</i> -----	54
1.3 Mausstamm-spezifische Unterschiede der Mikroglia -----	55

1.4	Charakterisierung inhibitorischer Mikroglia <i>in vitro</i> -----	56
2.1	GM-CSF induziert die Anwesenheit funktionell kompetenter DC <i>in vivo</i> -----	59
2.2	Einfluss von intrazerebralem GM-CSF auf Mikroglia-----	61
2.3	Vergleich der i.c.v. Applikation von GM-CSF und IFN $\gamma$ -----	65
2.4	Rekrutierung von Zellpopulation in das ZNS-----	65
3	Fazit und Ausblick-----	67
<b>IV</b>	<b>Zusammenfassung-----</b>	<b>69</b>
	Summary-----	71
<b>V</b>	<b>Material und Methoden-----</b>	<b>73</b>
<b>1</b>	<b>Bezugsquellennachweis-----</b>	<b>73</b>
1.1	Chemikalien-----	73
1.2	Geräte und Materialien-----	74
<b>2</b>	<b>Medien und Puffer-----</b>	<b>76</b>
<b>3</b>	<b>Proteine-----</b>	<b>77</b>
3.1	Antikörper-----	77
3.2	Enzyme-----	78
3.3	Zytokine-----	78
<b>4</b>	<b>Nukleinsäuren, Primer und Nukleotide-----</b>	<b>78</b>
4.1	Nukleinsäuren-----	78
4.2	Primer-----	79
4.3	Nukleotide-----	80
<b>5</b>	<b>Tierversuche-----</b>	<b>80</b>
5.1	Mäuse-----	80
5.2	Präparation neonataler Hirnzellen-----	81
5.3	Präparation von Knochenmark-----	81
5.4	Präparation der Milz-----	82
5.5	Präparation der Intrazerebralen Leukozyten-----	82
5.6	Pumpenimplantation-----	83
<b>6</b>	<b>Zellkultur-----</b>	<b>84</b>
6.1	Neonatale Gliakultur-----	84
6.2	Sekundärkultur in GM-CSF-----	85
6.3	Knochenmarkskultur in GM-CSF-----	85
6.4	T-Zellklone-----	86
6.5	Herstellung von GM-CSF und IL-2 Überstand-----	86

6.5.1	Kultivierung der P3X63/O-GM-CSF Zellen	86
6.5.2	ELISA	87
6.6	Kultivierung von <i>T. gondii</i>	87
6.6.1	Kultivierung von Wirtszellen	87
6.6.2	<i>In vitro</i> Passage	88
6.6.3	<i>In vivo</i> Passage	88
6.6.4	Präparation von Toxoplasma-Lysat (TLA)	89
<b>7</b>	<b>Immunbiologische Methoden</b>	<b>90</b>
7.1	Proliferationsassays	90
7.1.1	MLR – „mixed leukocyte reaction“	90
7.1.2	Antigenspezifische T-Zellproliferation	91
7.1.3	APC unabhängige T-Zellproliferation	91
7.1.4	Kokultur im Transwell	92
7.2	Aufreinigung über MACS	92
7.3	Aufreinigung über Nylonwolle	93
7.4	Durchflusszytometrie	93
7.5	Immunhistologie	94
<b>8</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>95</b>
8.1	Präparation von Gesamt-RNA	95
8.2	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	96
8.3	Synthese der cDNA	97
8.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	97
8.5	Agarose-Gelelektrophorese	98
8.6	Quantitative Polymerasekettenreaktion (Realtime PCR)	98
<b>VI</b>	<b>Referenzen</b>	<b>100</b>
<b>VII</b>	<b>Anhang</b>	<b>113</b>
1	Abkürzungsverzeichnis	113
2	Danksagung	115
3	Eidesstattliche Erklärung	116

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: DC-ähnlicher Phänotyp von GM-CSF differenzierten Mikroglia aus BALB/c Mäusen..... 20

Abb. 2: Allostimulatorische Kapazität GM-CSF differenzierter Mikroglia aus BALB/c Mäusen ..... 21

Abb. 3: Stimulatorische Aktivität GM-CSF differenzierter BALB/c Mikroglia auf geprimte T-Zellen ..... 22

Abb. 4: DC-ähnlicher Phänotyp von GM-CSF differenzierten Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen ..... 23

Abb. 5: Keine stimulatorische Aktivität für naive T-Zellen von Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen..... 24

Abb. 6: Keine stimulatorische Aktivität von Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen für geprimte T-Zellen 25

Abb. 7: Vergleich der allostimulatorischen Kapazität von Mikroglia aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen gegenüber naiven T-Zellen aus FVB-Mäusen..... 25

Abb. 8: Hemmung der T-Zellaktivierung eines T-Zellklons durch C57BL/6 Mikroglia..... 26

Abb. 9: Hemmung der Proliferation naiver T-Zellen durch C57BL/6 Mikroglia: Milz-DC als APC. 27

Abb. 10: Hemmung der Proliferation naiver T-Zellen durch C57BL/6 Mikroglia: BM-DC als APC. 28

Abb. 11: APC unabhängige T-Zellproliferation wird nicht durch C57BL/6 Mikroglia inhibiert..... 30

Abb. 12: Hemmung der T-Zellproliferation durch Mikroglia ist Zellkontakt-abhängig ..... 31

Abb. 13: Die relative Expression beschriebener inhibitorischer Faktoren ist in C57BL/6 Mikroglia nicht erhöht ..... 33

Abb. 14: Vergleichbare relative Expression der inhibitorischen Liganden PD-L1 und PD-L2 ..... 34

Abb. 15: Vergleichbare relative Expression der inhibitorischen Rezeptoren für CD200 ..... 35

Abb. 16: C57BL/6 Mikroglia exprimieren geringfügig weniger TRAIL als BALB/c Mikroglia ..... 36

Abb. 17: I.c.v. GM-CSF Gabe erhöht die Zahl mononukleärer Zellen im ZNS..... 38

Abb. 18: I.c.v. GM-CSF Gabe steigert den Anteil der ICL mit einer hohen CD45 Expression..... 38

Abb. 19: I.c.v. GM-CSF Gabe steigert die Zahl der ICL mit einer hohen CD45 Expression..... 39

Abb. 20: GM-CSF im Gehirn erhöht den Anteil myeloider ICL ..... 40

Abb. 21: I.c.v. GM-CSF Gabe erhöht den Anteil myeloider DC ..... 41

Abb. 22: I.c.v. GM-CSF Gabe induzierte die Zunahme der Gesamtzahl myeloider DC ..... 42

Abb. 23: Intrazerebrale GM-CSF Behandlung hat kaum Einfluss auf die kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86..... 43

Abb. 24: Erhöhte Expression von MHCII und CD80 auf ICL aus GM-CSF behandelten Mäusen .... 44

Abb. 25: Erhöhte Anzahl aktivierter CD11c<sup>+</sup> ICL in GM-CSF behandelten Mäusen..... 45

Abb. 26: Vermehrte Zahl CD11b<sup>+</sup> Zellen in der Region der GM-CSF Infusion. .... 46

Abb. 27: Lokale Zunahme von CD11c<sup>+</sup> ICL mit abgerundeter Morphologie nach i.c.v. GM-CSF Gabe ..... 48

Abb. 28: Erhöhte Immunreaktivität gegen MHCII nach i.c.v. GM-CSF Gabe ..... 49

Abb. 29: GM-CSF i.c.v. induziert Ki67 Immunreaktivität im Gehirn..... 50

Abb. 30: Allostimulatorische Aktivität von CD11c<sup>+</sup> ICL nach i.c.v. GM-CSF Gabe ..... 51

# I Einleitung

## 1 Immunantworten im Zentralen Nervensystem

Das Zentrale Nervensystem (ZNS) wurde lange für ein immunprivilegiertes Organ gehalten, in dem keine immunologischen Reaktionen stattfinden können. Das beruhte vor allem auf Ergebnissen von Transplantationsexperimenten der 1940er und 1950er Jahre: Transplantationen von allogenen, „nicht-selbst“ Hauttransplantaten in das ZNS wurden toleriert. Nur durch eine zweite Transplantation von fremdem Gewebes in die Peripherie, und damit außerhalb des ZNS, konnte eine Abstoßungsreaktion auch im ZNS initiiert werden (Medawar, 1948). Zusätzlich fehlt im gesunden Gehirn die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II Molekülen, die für die Antigenpräsentation notwendig sind (Schachner und Sidman, 1973). Allerdings verdichtete sich in den 1970er Jahren die Evidenz, dass auch Immunzellen - insbesondere T-Zellen - im Gehirn während inflammatorischer Prozesse auftreten können (Doherty und Zinkernagel, 1975; Hapel, 1975). Die Ansicht, das ZNS wäre ein vom Immunsystem ignoriertes Organ, ist mittlerweile einem dynamischeren Szenario gewichen. In diesem Szenario wird eine Immuntoleranz durch eine Reihe von Mechanismen aktiv aufrechterhalten, wie z. B. die strenge Kontrolle des Aktivierungsstatus lokaler Antigen präsentierender Zellen (APC) und die erschwerte Einwanderung von T-Zellen ins Gehirn im Gegensatz zu anderen Organen (Becher et al., 2006). Es wird immer noch kontrovers diskutiert, welche Zellpopulationen im ZNS letztendlich die entscheidende Rolle bei der Präsentation von Antigenen spielen. Innerhalb der APC sind Dendritische Zellen (DC) von besonderer Bedeutung. Sie gelten als Hauptinitiatoren der Immunantwort und bestimmen deren Entwicklung (Banchereau und Steinman, 1998). Sie wurden im gesunden und entzündeten ZNS erst 1996 bei Ratten beschrieben (Matyszak und Perry, 1996) und wenig später auch im Gehirn von Mäusen nachgewiesen (Fischer et al., 2000; Suter et al., 2000; Serafini et al., 2000). Zunächst konnte über die Anwesenheit von DC im humanen Gehirn nur spekuliert werden (Ulvestad et al., 1994). Aber auch dort konnten DC im ZNS mittlerweile identifiziert werden (Hanly und Petit, 1998). Außerdem werden Mikroglia, die als ZNS residente Makrophagen gelten, ebenfalls als funktionelle APC im ZNS diskutiert (Shrikant und Benveniste, 1996; Perry, 1998; Becher et al., 2000).

## 1.1 Das ZNS als immunprivilegiertes Organ

Das ZNS ist ein komplexes Netzwerk bestehend aus Neuronen und verschiedenen Gliazellpopulationen - den Astrozyten, den Oligodendrozyten und der Mikroglia. Astrozyten stabilisieren das Umfeld der Neurone und sichern damit deren Überleben und Funktionsfähigkeit. Die Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden um die Axone und ermöglichen damit die saltatorische Weiterleitung von Aktionspotentialen. Mikroglia gelten als den Gewebsmakrophagen zugehörig, die das Gehirn überwachen und Veränderungen detektieren. Die geringe Regenerationsfähigkeit der Neurone macht den strikten Erhalt der ZNS-Homöostase zwingend notwendig für deren Funktionalität. Generell geht die Beseitigung von Pathogenen oft mit einer teilweisen Zerstörung eigener infizierter Zellen und des umliegenden Gewebes einher. Daher hat das ZNS einzigartige Mechanismen entwickelt, potentiell gefährliche Immunreaktionen strikt zu verhindern oder zumindest zu kontrollieren. Dazu zählen die Blut-Hirn-Schranke (BHS), Besonderheiten bei der Verbindung zum lymphatischen System, eine immunsuppressive Umgebung und die Abwesenheit professioneller APC.

### 1.1.1 Blut-Hirn-Schranke

Die BHS trennt als anatomische Barriere das ZNS von der peripheren Blutzirkulation. Sie zeichnet sich durch eine strukturelle Besonderheit der zerebrovaskulären Endothelzellen aus. Diese sind nicht fenestriert, sondern durch sogenannte „tight junctions“ verbunden, welche einen besonders engen Zusammenhalt des Zellverbands bewirken. Im Gegensatz zu anderen Endothelzellen exprimieren die Blutgefäße der intakten BHS nur sehr geringe Mengen von Adhäsionsmolekülen, die für die Leukozytenmigration mitverantwortlich sind (Bart et al., 2000). Zusätzlich sind die Endothelzellen umgeben von einer Basallamina, die durch Ausläufer von Astrozyten gebildet wird. Zwischen der Basallamina und den Endothelzellen liegt der Perivaskulärraum und darin die Perizyten. Perizyten gehören zu der Familie der vaskulären glatten Muskelzellen (Allt und Lawrenson, 2001). Sie stabilisieren die Mikrogefäße und stellen einen großen Teil der abluminalen endothelialen Oberfläche dar (von Tell et al., 2006). Perivaskuläre Makrophagen sind phagozytierende Zellen, die vom Knochenmark abstammen und sitzen ebenfalls abluminal an der Basallamina (Perry et al., 1993). Diese strategische Position ist möglicherweise so ausgewählt, da Veränderungen in der ZNS-Homöostase detektiert und effizient an das periphere Immunsystem

weiter geleitet werden können (Hickey und Kimura, 1988). Die Astrozytenausläufer, die die Endothelzellen an der Basallamina vollständig umgeben, haben wahrscheinlich eine ähnliche Funktion. Die BHS umgibt das gesamte ZNS mit Ausnahme des Plexus choroideus (de Boer und Gaillard, 2006). Der Plexus choroideus sezerniert den *Liquor cerebrospinalis* (Liquor) in die Hirnventrikel, hat eine blattartige Struktur und ragt in die Ventrikel hinein. Er ist mit stark fenestrierten Kapillaren vaskularisiert. Die Struktur ist überzogen mit Endothelzellen, die ebenfalls durch „tight junctions“ verbunden sind. Hier ist die Blut-Liquor-Schranke lokalisiert (Cserr und Bundgaard, 1984). Im Gegensatz zur BHS fehlt hier die von den Astrozytenausläufern gebildete Basallamina.

### 1.1.2 Verbindungen des ZNS zum lymphatischen System

Das ZNS ist umgeben vom Liquor. Der Liquor füllt die perivaskulären Räume, die Ventrikel und den Subarachnoidalen Spalt zwischen *Arachnoidea* und *Pia mater*. Einige Experimente weisen darauf hin, dass auch eine ZNS Drainage zu den peripheren Lymphknoten (LN) existiert (Matyszak und Perry, 1996; Carson et al., 1999). Intrazerebral injiziertes Antigen aus LCMV oder LCMV infizierte DC werden zum zervikalen LN transportiert, allerdings wird dadurch keine Immunantwort ausgelöst. Eine funktionelle Immunantwort entsteht nur dann, wenn die Maus in der Peripherie mit dem Virus infiziert war (Carson et al., 1999). Auch partikelförmiges Antigen wird zum zervikalen LN transportiert, wenn es in das ZNS implantiert wurde (Matyszak und Perry, 1996). Die Drainage kann auch durch inflammatorische Zytokine induziert werden. Nach systemischer Gabe von TNF $\alpha$  findet man Moleküle aus ZNS und Liquor in der peripheren Blutzirkulation (Dickstein et al., 2000). Antigene aus dem ZNS finden also sehr wohl unter bestimmten Umständen ihren Weg in die Peripherie. Welche Relevanz dies für die Aufrechterhaltung einer Immunreaktion im ZNS hat, ist allerdings noch unklar, wie durch die Verwendung alymphoplastischer Mäuse (aly/aly) gezeigt wurde. Diese tragen eine Mutation in der NF $\kappa$ B induzierenden Kinase NIK und sind charakterisiert durch die systemische Abwesenheit aller LN (Shinkura et al., 1999). Auch ohne LN ist die Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalopathie (EAE) durch den adoptiven Transfer MOG-reaktiver T-Zellen möglich (Greter et al., 2005). Das Experiment zeigt, dass die Aufrechterhaltung der Immunantwort im ZNS - einmal gestartet durch die Erstaktivierung der T-Zellen - nicht mehr zwingend abhängig ist vom lymphatischen System, sie funktioniert auch ohne LN.

### 1.1.3 Immunsuppressive Umgebung im ZNS

Da in der Peripherie aktivierte Immunzellen immer wieder die physikalischen Barrieren zum ZNS überwinden können (Hickey et al., 1991; Flugel et al., 1999), hält das ZNS zum Schutz zusätzliche immunsuppressive Mechanismen bereit. Während der Immunreaktionen im ZNS werden unter anderem immunsuppressive Moleküle wie Neuropeptide, das inhibitorische Zytokin TGF $\beta$  und Ganglioside freigesetzt (Wei und Jonakait, 1999). Die im Liquor vorkommende Konzentration von TGF $\beta$  reicht aus, um die Proliferation von T-Zellen zu inhibieren (Taylor und Streilein, 1996) und die Expression chemoattraktiver Moleküle zu reduzieren, die u.a. von Astrozyten gebildet werden (Weiss und Berman, 1998). Zusätzlich wird im ZNS die Zahl aktivierter T-Zellen durch die konstitutive Expression von CD95 Ligand (FasLigand) reguliert. Dadurch wird die apoptotische Eliminierung aktivierter T-Zellen ermöglicht (Becher et al., 1998). Ein weiterer negativer Mechanismus ist die Induktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) in Mikroglia. Die Induktion erfolgt über Interferon (IFN) $\gamma$  - z.B. gebildet von enzephalitogenen T-Zellen - und führt zum Arrest der T-Zellen oder zur Apoptose (Kwidzinski et al., 2005). Im Gehirn findet eine Immunregulation zusätzlich über Interaktion von CD200 und CD200-Rezeptor (CD200R) statt. Die Bindung des CD200-Liganden sorgt für eine Immunsuppression von CD200R exprimierenden Zellen. Der Rezeptor ist auf myeloiden Zellen exprimiert. Nach Aktivierung der Zellen kann der Ligand auf T-Zellen und B-Zellen induziert werden, ebenso auf DC und Neuronen. Damit können diese Zellen im Kontakt mit myeloiden Zellen deren Immunsuppression auslösen. CD200 defiziente Mäuse sind susceptibler gegenüber autoimmunen Erkrankungen (Hoek et al., 2000). Außerdem kann Immunregulation im Gehirn vermittelt werden über die Interaktion des auf T-Zellen und anderen hämatopoetischen Zellen exprimierten PD-1 („programmed death“-1) Rezeptors mit den Liganden PD-L1 und PD-L2 auf APC und nicht hämatopoetischem Gewebe. Durch die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand wird die Proliferation der T-Zellen negativ reguliert. Fehlt z.B. die Interaktion mit PD-L1 durch Blockierung mit einem spezifischen Antikörper, so ist der Verlauf von Autoimmunerkrankungen im Gehirn deutlich stärker (Keir et al., 2008).

#### 1.1.4 Abwesenheit von APC im ZNS

Ein weiteres Merkmal des ZNS-Immunistatus ist die Abwesenheit von klassischen APC wie DC im Hirngewebe. Dies konnte für Mensch, Maus und Ratte (Matyszak und Perry, 1996; McMenamin, 1999; Suter et al., 2000; Serafini et al., 2000) gezeigt werden. Da DC überall im Organismus zu finden sind, ist ihr Ausschluss vom ZNS auffällig und möglicherweise Resultat des inhibitorischen Effekts der neuronalen Umgebung auf die DC Differenzierung. Zirkulierende Monozyten stellen sowohl für Mikroglia als auch für DC die Vorläuferzellen dar (Bechmann et al., 2005). Wahrscheinlich differenzieren die Vorläufer im Gehirn unter „steady state“ Bedingungen eher zu Mikroglia und perivaskulären Makrophagen. DC und deren myeloide Vorläufer fehlen zwar im ZNS-Gewebe, sind aber eng assoziiert mit dem ZNS. Man findet sie in der *Dura mater*, dem Perivaskulärraum und dem Plexus choroideus (Matyszak und Perry, 1996; McMenamin, 1999). Sowohl die Meningen als auch der Plexus choroideus sind nicht durch die BHS ausgekleidet und stehen daher im Kontakt mit dem Liquor. Daher sind die DC innerhalb dieser Grenzstrukturen optimal lokalisiert um Antigene zu detektieren, die zwischen Gehirn und dem restlichen Organismus ausgetauscht werden. DC im humanen Plexus choroideus sind als inhibitorisch beschrieben. Sie tragen keine kostimulatorischen Moleküle auf ihrer Oberfläche und produzieren das inhibitorische Zytokin Interleukin (IL)-10 (Serot et al., 2000). Sowohl residente als auch infiltrierende APC im ZNS wirken während manchen pathologischen Prozessen im Gehirn durch die Abgabe von reaktiven Stickoxiden (NO) inhibierend auf die T-Zellproliferation, wie zum Beispiel am Mausmodell in der akuten Phase der EAE gezeigt werden konnte (Juedes und Ruddle, 2001).

Zusammengefasst tragen diese Mechanismen im ZNS dazu bei, die Initiation und Aufrechterhaltung von Immunreaktionen zu erschweren.

#### 1.2 Migration in das ZNS: Immunreaktion

Obwohl die Immunreaktion im Gehirn streng kontrolliert und supprimiert wird, kann es zum Zusammenbruch der BHS bei neurologischen Erkrankungen kommen. Gliazellen exprimieren Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Diese antworten auf Stimulierung mit der Sekretion inflammatorischer Moleküle, wie Zytokine und Chemokine (Bailey et al., 2006). Dadurch wird auch im ZNS wie bei anderen Organen der Eintritt von Leukozyten während inflammatorischer

Reaktionen vermittelt. Die weisenden Signale, die die Transmigration von Leukozyten in das Gehirn steuern, wie auch die migratorischen Wege der Leukozyten sind größtenteils erforscht (Man et al., 2007). TNF $\alpha$  als proinflammatorisches Zytokin ist in der Lage, die Permeabilität der BHS deutlich zu erhöhen, indem es die Adhäsion und die transendotheliale Migration der Leukozyten verstärkt (Fabry et al., 1995; Mark und Miller, 1999).

Verschiedene Routen der Leukozytenmigration in das ZNS sind beschrieben. Der erste ist der klassische Weg der Zellen über das Blut in den parenchymalen, perivaskulären Raum (Bechmann et al., 2007). Dieser verläuft ähnlich wie die Migration aktivierter Zellen in inflammatorisches peripheres Gewebe (Engelhardt und Ransohoff, 2005). Die Leukozyten rollen dazu zunächst mit einer durch Selektine vermittelten lockeren Bindung an den Endothelzellen entlang. Dadurch wird die Geschwindigkeit der Lymphozyten, die eigentlich über den Blutstrom bestimmt wird, verlangsamt. Die Lymphozyten können die Oberfläche der Endothelzellen auf Chemokinen und Aktivierungsmarkern wie den Integrin-Liganden VCAM und ICAM-1 überprüfen. Treffen sie dort auf Chemokine, so werden auf der Oberfläche der Leukozyten Integrine wie LFA-1 und VLA-4 geclustert und die Leukozyten-Endothelzellbindung wird stärker. Die Leukozyten können die Endothelzellbarriere schließlich überwinden, indem sie entlang des chemoattraktiven Gradienten entweder zwischen oder direkt durch die Endothelzellen hindurch wandern. Der chemoattraktive Gradient besteht aus Chemokinen, die am Ort der Entzündung gebildet werden, dort die höchste Konzentration haben und durch Diffusion einen Gradienten bilden, der Leukozyten zum Zentrum der Entzündung leitet. Der Prozess des Leukozytenaustritts aus dem Blut in das Gewebe wird als Extravasation bezeichnet. Damit ist die Transmigration der Leukozyten in den Perivaskulärraum abgeschlossen. Durch Matrixmetalloproteasen können die Leukozyten tiefer in das Gewebe eindringen (Butcher, 1991; Springer, 1994; Butcher et al., 1999). Beim Eintritt in das ZNS müssen die Leukozyten eine weitere Hürde, die Basallamina, überwinden. Sie wird von Astrozyten gebildet und besteht aus Kollagen, Elastin, Laminin und Fibronectin (Hurwitz et al., 1993; Hayashi et al., 1997).

Zwei weitere Wege zum Eintritt in das ZNS sind beschrieben: der eine führt über den Plexus Choroideus in den Liquor, der andere über die Kapillaren in der Pia mater in den subarachnoidalen Raum (Ransohoff et al., 2003). Die verschiedenen Leukozytenpopulationen präferieren dabei den Eintritt in das ZNS über unterschiedliche Wege, auch abhängig von der relativen Expression der Adhäsionsmoleküle (Engelhardt und Ransohoff, 2005). Obwohl also im ZNS die Initiierung von Immunreaktionen strenger kontrolliert wird, können auch hier

Chemokine unter speziellen Bedingungen Immunzellen aus dem Blut oder von anderen Regionen des Gehirns rekrutieren (Britschgi und Wyss-Coray, 2007).

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass auch im intakten ZNS eine geringe Zahl aktivierter T-Zellen routinemäßig das ZNS patrouilliert (Hickey, 2001), wenn auch in viel geringerem Ausmaß als in der Peripherie. Unabhängig von der Antigenpezifität treten aktivierte T-Zellen wenige Stunden nach peripherer Injektion auch im ZNS auf (Hickey et al., 1991). Treffen diese Zellen jedoch nicht auf ihr Antigen, so verlassen sie das ZNS wieder ohne die Integrität des Organs zu stören.

### 1.3 Mikroglia im ZNS

Mikroglia wurden von del Rio-Hortega erstmals 1932 als eine eigenständige Klasse der Gliazellen beschrieben. Mikroglia stammen wie Leukozyten von mesenchymalen Stammzellen ab und differenzieren zu Mikroglia, wenn sie das Gehirn erreichen (Bechmann et al., 2007). Mikroglia gelangen vor der Geburt in das Gehirn. Sie sind langlebig und werden nur mit einer langsamen Erneuerungsrate vom Knochenmark regeneriert. Im Gegensatz dazu werden perivaskuläre Makrophagen und Meningen-assoziierte Makrophagen ständig ausgetauscht; sie haben in der Maus oder der Ratte eine Austauschrate von 14 Wochen (Hickey und Kimura, 1988; Hickey et al., 1992; Bechmann et al., 2001a). Experimente mit knochenmarkschimären Mäusen haben gezeigt, dass eine Subpopulation endogener Zellen im ZNS existiert, die als perivaskuläre Zellen von Knochenmarksvorläufern abstammen (Hickey und Kimura, 1988). Diese sind fähig, Antigene an Lymphozyten zu präsentieren. Die Präsentation von Antigenen durch Astrozyten in der frühen Phase der Immunreaktionen wird heutzutage größtenteils ausgeschlossen (Matsumoto et al., 1992).

Mikroglia in adulten Tieren zeigen in verschiedenen anatomischen Regionen des Gehirns eine starke Heterogenität. Es gibt große Unterschiede in der Morphologie, dem Aktivierungsstatus und der Expression von MHC und anderen immunologischen Oberflächenrezeptoren (Ulvestad et al., 1994; Schmid et al., 2002). Ohne inflammatorischen Stimulus sind Mikroglia nicht in der Lage, T-Zellen zu stimulieren, wenn sie aus dem adulten Maushirn isoliert werden (Havenith et al., 1998). Durch die Entwicklung der Multi-Photonen Mikroskopie entstand die Möglichkeit, Vorgänge im lebenden Gewebe *in situ* zu visualisieren. Durch den Einsatz transgener Mäuse, deren Mikroglia ubiquitär GFP exprimierten, konnte gezeigt werden, dass Mikroglia im gesunden ZNS aktiv die Aufgabe der Überwachung des Gehirns übernehmen. Mikroglia reorganisieren ihre langen

Fortsätze innerhalb von Minuten, um innerhalb des neuronalen Netzwerks Veränderungen zu detektieren (Nimmerjahn et al., 2005; Davalos et al., 2005).

Als Antwort auf Verletzungen, zerebrale Ischämie (Schlaganfall) oder inflammatorische Stimuli werden Mikroglia aktiviert, proliferieren, migrieren zum Ort des Geschehens und phagozytieren Zellreste (Power und Proudfoot, 2001). Sie übernehmen dabei sowohl die Aktivierung als auch die Eingrenzung der inflammatorischen Antwort, um die Beschädigung des sensiblen Neuronengewebes einzudämmen.

Aktivierte Mikroglia regulieren im ZNS-Parenchym unter nahezu allen inflammatorischen Bedingungen die Expression von MHCII herauf (Maehlen et al., 1989; Streit und Graeber, 1993; Ulvestad et al., 1994; Sedgwick et al., 1998). Sie erhöhen ebenfalls die Expression kostimulatorischer Liganden auf ihrer Oberfläche, wie CD40, CD80 und CD86, welche ihnen die Möglichkeit der T-Zellstimulation geben (Becher et al., 2000; Aloisi, 2001; Bechmann et al., 2001b; McMahon et al., 2005). Auf der anderen Seite können Mikroglia nach der Detektion von Veränderungen im ZNS durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen das Immunsystem alarmieren und für die Rekrutierung von Zellen aus der Peripherie sorgen (Garden und Moller, 2006).

Eine weitere wichtige Aufgabe von Mikroglia ist die Phagozytose, z.B. die Aufnahme von Zellresten oder Proteinablagerungen. Dies ist wichtig, da diese Materialien die Remyelinisierung und das Axonwachstum verhindern (Filbin, 2003). Wenn Mikroglia hingegen apoptotische Zellen phagozytieren wird die Produktion von IL-12, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  genauso wie die Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen deutlich reduziert (Magnus et al., 2001).

## 2 Dendritische Zellen

DC besitzen eine einzigartige Stellung im Immunsystem und nehmen bei der Entwicklung einer Immunantwort eine entscheidende Rolle ein. Sie patrouillieren durch peripheres Gewebe und können Veränderungen wie Infektionen detektieren und eine Immunantwort initiieren. Dies ist möglich durch ein breites Spektrum an Rezeptoren, die bei der angeborenen Immunität von großer Bedeutung sind und Pathogene und deren Bestandteile erkennen. Dies führt zu der Aktivierung der DC (Banchereau und Steinman, 1998). Eine große Rolle bei der Erkennung von Pathogenen spielen die „toll-like“-Rezeptoren (TLR). Diese Rezeptoren binden z.B. an Lipopolysaccharide (LPS/TLR4), Zymosan und bakterielle Lipoproteine (TLR2), und verschiedene

Nukleinsäuren (TLR 3, TLR7 und TLR9), die entweder aufgrund ihrer endolysosomalen Lokalisation innerhalb der Wirtszelle oder aufgrund ihrer Modifikation als fremd erkannt werden (Iwasaki und Medzhitov, 2004). Die Aktivierung der DC kann zur Sekretion von IL-12, Typ I und Typ II Interferonen (IFN) führen (Banchereau und Steinman, 1998; Guermontprez et al., 2002). Zusätzlich tragen DC Rezeptoren für verschiedene Chemokine und Zytokine und können so Veränderungen im Gewebe schnell und effizient detektieren. DC bilden die Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Sie können sehr verschiedene Arten von Antigenen aufnehmen und gebunden an MHC I oder MHC II T-Zellen präsentieren. DC besitzen als einziger Zelltyp die Fähigkeit zur Erstaktivierung naiver T-Zellen (Inaba und Steinman, 1984). Zusätzlich steuern sie die Qualität der T-Zellantwort, indem sie die Ausdifferenzierung zu den unterschiedlichen Klassen von T-Effektorzellen lenken (siehe 2.1). Die adaptive Immunantwort ist notwendig für die Resistenz gegenüber Pathogenen und Tumoren. Auf der anderen Seite sind DC auch an der Ausdifferenzierung regulatorischer T-Zellen beteiligt, die ihrerseits aktivierte T-Zellen supprimieren können. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung von Autoimmunität und Transplantatabstoßung. Mittlerweile sind mehrere Subpopulationen von DC bekannt.

## 2.1 Subpopulationen von DC

DC stammen von Vorläuferzellen im Knochenmark ab. Als Detektoren für Infektionen patrouillieren sie als unreife Zellen in nahezu allen Geweben. Unreife DC sind charakterisiert durch ihre geringe MHC II Expression und tragen ebenfalls nur geringe Mengen der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche. Sie sind dafür hocheffizient in der Aufnahme und Prozessierung von Antigenen (Banchereau und Steinman, 1998). Nach Aktivierung in der Peripherie verändern sie ihr Chemokinrezeptormuster - entscheidend ist hierbei die gesteigerte Expression von CCR7 - (Banchereau und Steinman, 1998; Sallusto et al., 1998), wandern vom peripheren Gewebe zu den drainierenden LN über die afferenten lymphatischen Gefäße entlang eines Chemokin-Gradienten und reifen auf diesem Weg (Cella et al., 1997). Reife DC in den sekundären lymphatischen Organen exprimieren hohe Mengen von MHC II und kostimulatorischen Molekülen. So sind sie effizient ausgerüstet, um mit Lymphozyten an den Eintrittsstellen oder den Übergängen zwischen T- und B-Zellregion im LN in Kontakt zu treten (Banchereau und Steinman, 1998). Als sehr heterogene Zellgruppe zeichnen

sie sich dabei durch ein breites Spektrum an Zytokinsekretion und T-Zellpolarisationfähigkeit aus und weisen sehr unterschiedliche anatomische Lokalisationen und Oberflächenexpressionsmuster auf (McMahon et al., 2006). In Mäusen können DC in zwei große Gruppen eingeteilt werden, die konventionellen und die plasmazytoiden DC. Gemeinsam ist beiden Gruppen die Expression des DC typischen Oberflächenprotein CD11c (Ueno et al., 2007).

Konventionelle DC lassen sich weiter unterteilen in CD11b<sup>+</sup> und CD8α<sup>+</sup>. Die erste Gruppe zeichnet sich durch die Expression der myeloiden Merkmale CD11b und F4/80 aus. Dabei sind Subpopulationen beschrieben, die sich in der Expression von CD4 und CD205 unterscheiden, obwohl keine relevanten funktionellen Unterschiede festgestellt wurden (Shortman und Liu, 2002). CD11b<sup>+</sup> DC sind spezialisiert auf die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Dudziak et al., 2007). Ihr Zytokinprofil bevorzugt aber wahrscheinlich die Entwicklung einer T<sub>H</sub>2 T-Zellantwort (Penna et al., 2001). Allerdings können sie abhängig von der Antigenmenge, der TLR Stimulation oder der Anwesenheit exogener Zytokine auch die Entwicklung von T-Zellen Richtung T<sub>H</sub>1 induzieren (Boonstra et al., 2003).

Die andere große Gruppe konventioneller DC zeichnet sich durch die Oberflächenexpression von CD8α aus. Sie gelten nach ihrer Reifung als Hauptproduzenten von IL-12 und begünstigen die Entwicklung einer T<sub>H</sub>1 Antwort (Maldonado-Lopez et al., 1999; Hochrein et al., 2001). Außerdem können diese konventionellen CD8α<sup>+</sup> DC auch exogenes Antigen auf MHC der Klasse I präsentieren (Shortman und Naik, 2007). Unter „stady state“ Bedingungen vermitteln sie wahrscheinlich periphere Toleranz durch die Präsentation endogener Antigene, ohne die für die T-Zellstimulation wichtigen kostimulatorischen Moleküle (Steinman et al., 2000).

Plasmazytoide DC sind ebenfalls CD8α<sup>+</sup> und steigern diese Expression zusätzlich nach Aktivierung. Sie tragen das B-Zell-spezifische Oberflächenmerkmal B220, besitzen aber eine geringere Oberflächenexpression von CD11c und geringe Mengen des Granulozytenmerkmals Gr-1 (Asselin-Paturel et al., 2001). Sie weisen ebenfalls nur geringe Mengen von MHCII auf ihrer Oberfläche auf, haben eine geringere T-Zell-stimulatorische Aktivität als konventionelle DC und induzieren *in vitro* eher regulatorische T-Zellen (Bilsborough et al., 2003). Daher scheinen sie *in vivo* für die Induktion von Toleranz verantwortlich zu sein (Martin et al., 2002). Im Gegensatz zu konventionellen DC sind plasmazytoide DC nach der Reifung die Hauptproduzenten von Typ I IFN, und damit u.a. wichtig für die Abwehr von Viren (Asselin-Paturel et al., 2001).

## 2.2 DC im ZNS

DC sind aufgrund des immunprivilegierten Status nicht im gesunden ZNS Gewebe zu finden (Becher et al., 2000). Dennoch sind sie in den Meningen, dem Plexus Choroideus und dem Perivaskulärraum nahe der BHS lokalisiert (Matyszak und Perry, 1996; McMEnamin, 1999). Injiziert man DC intrathekal in das ZNS können sie in die drainierenden zervikalen LN migrieren und dort naiven T-Zellen Antigen präsentieren. Sie können also das ZNS verlassen und präsentieren so ZNS-eigene Antigene in der Peripherie (Carson et al., 1999; Karman et al., 2004).

Im Gegensatz zur Situation im gesunden ZNS, sind DC im ZNS unter inflammatorischen Bedingungen auch im ZNS lokalisiert. Die Anwesenheit von DC im ZNS (ZNS-DC) konnte bei Infektion mit Viren (McMahon et al., 2005), Bakterien (Pashenkov et al., 2002) und Prionenerkrankungen (Rosicarelli et al., 2005) gezeigt werden. Auch bei einer durch den Parasiten *Toxoplasma gondii* ausgelösten Enzephalitis sind CD11c<sup>+</sup> Zellen im ZNS Parenchym detektierbar (Fischer und Reichmann, 2001). Diese ZNS-DC zeichnen sich durch einen reifen Oberflächenphänotyp (MHCII<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>) aus, gehören zu der Subpopulation CD11b<sup>+</sup> konventioneller DC und aktivieren effizient naive T-Zellen *ex vivo* (Fischer et al., 2000; Fischer und Reichmann, 2001). In Konsistenz mit den einhergehenden Beschreibungen von CD11b<sup>+</sup> DC in der Peripherie produzieren sie IL-12 und beeinflussen die T-Zelldifferenzierung in Richtung T<sub>H</sub>1 Antwort. Dies wurde an OVA-transgenen T-Zellen gezeigt (Fischer und Reichmann, 2001). Auch bei einer Infektion mit dem murinem Hepatitis Virus (Trifilo und Lane, 2004) und Theilers murinem Enzephalitis Virus (Trifilo und Lane, 2004) akkumulieren reife myeloide, CD11b<sup>+</sup> DC im ZNS.

DC sind ebenfalls im ZNS zu finden, wenn die Inflammation durch eine Verletzung stattfindet, wie z.B. bei zerebraler Ischämie. In zwei Modellen - der fokalen kortikalen Ischämie durch Photothrombose sowie dem Verschluss der *Arteria cerebri media* - sind DC im ZNS nachzuweisen (Reichmann et al., 2002; Kostulas et al., 2002). Allerdings zeichnen sich die DC nach Phototrombose durch einen eher unreifen Phänotyp aus, während die DC nach Verschluss der *Arteria cerebri media* eine hohe Expression von MHCII zeigen. Bei Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose, einer progressiven degenerativen Erkrankung der Motorneurone, sind sowohl reife als auch unreife DC im Liquor zu finden (Henkel et al., 2004).

In der EAE - einem Modell der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (MS) - sind ebenfalls DC im ZNS Parenchym vorhanden (Suter et al., 2000; Serafini et al., 2000; Fischer und

Reichmann, 2001). Allerdings wird der Phänotyp dieser DC kontrovers diskutiert. Während die ZNS-DC von einigen Arbeitsgruppen als reife DC mit einer hohen Expression kostimulatorischer Moleküle beschrieben werden (Fischer and Reichmann, 2001; Serafini et al., 2000), zeigt eine andere Arbeitsgruppe deren unreifen Phänotyp. Dieser ist durch eine geringe Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche und inhibitorischer Eigenschaften bei der T-Zellproliferation charakterisiert (Suter et al., 2003). Auch im humanen System sind DC im ZNS von Patienten mit MS beschrieben. Myeloide DC sind im Liquor von MS-Patienten (Pashenkov et al., 2001) und in den perivaskulären Räumen in MS-Läsionen beschrieben (Plumb et al., 2003). Diese DC können nachweislich einen reifen Phänotyp annehmen, Myelin aufnehmen und dieses auch T-Zellen präsentieren (Serafini et al., 2006).

Durch die Nutzung transgener Mäuse, die MHCII nur auf DC exprimierten, konnte gezeigt werden, dass die alleinige Antigenpräsentation auf DC ausreicht, um enzephalitogene T-Zellen zu aktivieren. Die DC restringierte Antigenpräsentation ist also ausreichend für die Entwicklung einer ZNS-Inflammation (Greter et al., 2005).

Die Anwesenheit von DC ist somit unter den verschiedensten inflammatorischen Bedingungen im Gehirn nachgewiesen. Welche Funktion die Zellpopulationen dort ausüben und wie sie dorthin migrieren, ist allerdings noch nicht ausreichend erklärbar.

### **3 Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF)**

GM-CSF gehört wie Makrophagen Kolonie-stimulierender-Faktor (M-CSF) und Granulozyten Kolonie-stimulierender-Faktor (G-CSF) zu der Familie der Kolonie-stimulierenden-Faktoren (CSF). Diese wurden zunächst über ihre Fähigkeit definiert, *in vitro* Kolonien reifer myeloider Zellen aus Knochenmarksvorläufern zu generieren, die proliferieren und zu den entsprechenden Zelltypen differenzieren – Granulozyten und Makrophagen bei GM-CSF, Makrophagen bei M-CSF und Granulozyten bei G-CSF Kultivierung (Burgess und Metcalf, 1980). Später wurde klar, dass diese CSF *in vitro* auch auf reife myeloide Zellen wirken können, indem sie ihre inflammatorischen Eigenschaften verstärken, und ihnen damit eine größere Rolle als nur die hämatopoetischer Zellwachstumsfaktoren zukommen muss (Hamilton et al., 1980; Whetton und Dexter, 1989).

M-CSF ist auch unter nicht inflammatorischen Bedingungen im ZNS nachweisbar, und wird *in vitro* von vielen Zelltypen wie z.B. Fibroblasten, Makrophagen, T-Zellen, Endothelzellen und

glatten Muskelzellen produziert. Im Gegensatz dazu findet man die Expression von GM-CSF bei diesen Zelltypen normalerweise nur nach Infektionen oder inflammatorischen Stimuli wie LPS oder IFN $\gamma$  (Hamilton, 2008).

GM-CSF ist ein ca. 23 kD großes Protein, das 3 Glykosylierungsstellen aufweist. Sein Rezeptor ist ein Heterodimer bestehend aus einer Zytokin spezifischen  $\alpha$ -Kette und der „common  $\beta$ -chain“, die auch für den IL-3 und IL-5 Rezeptor verwendet wird und die Signalweiterleitung über den Jak/STAT-Signalweg vermittelt (Nicola et al., 1997). Der Rezeptor wird von Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert, vor allem von myeloiden Zellen und von Mikroglia (DiPersio et al., 1988; Sawada et al., 1993).

Obwohl GM-CSF für die Differenzierung hämatopoetischer myeloider Zellen verantwortlich ist, haben GM-CSF defiziente Mäuse überraschenderweise keine Defekte in der Entwicklung von Zellen der myeloiden Linie. Nur die Reifung pulmonaler Alveolarmakrophagen ist beeinträchtigt (Stanley et al., 1994). Damit stellt sich die Frage, inwieweit GM-CSF unter „steady state“ Bedingungen für die Hämatopoese eine Rolle spielt. Es wird spekuliert, dass die CSF ein sogenanntes CSF Netzwerk bilden, das teilweise redundant ist und damit überlappend die Funktion fehlender Hämatopoese-Faktoren ausgleichen kann (Hamilton, 2008).

Zusätzlich haben *in vitro* Experimente gezeigt, dass GM-CSF auch auf reife myeloide Zellen wirken kann. Damit ist die funktionelle biologische Rolle von GM-CSF wohl eher unter inflammatorischen Bedingungen zu sehen (Hamilton, 1993). Die Expression von GM-CSF ist auch im ZNS bei verschiedenen inflammatorischen Entzündungsreaktionen erhöht. Die Abwesenheit von GM-CSF in GM-CSF-defizienten Mäusen oder bei Blockade durch rekombinante Antikörper induziert in vielen pathologischen Prozessen wie Alzheimer oder EAE einen mildereren Verlauf der Inflammation oder Resistenz (Franzen et al., 2004). Die systemische Überexpression von GM-CSF führt hingegen zu einer Mobilisierung von Monozyten und anderer myeloider Populationen vom Knochenmark ins periphere Blut. Des Weiteren werden Monozyten aktiviert und zeigen *in vitro* eine gesteigerte Antwort gegenüber LPS Stimulation (Fleetwood et al., 2005). GM-CSF wird daher mittlerweile als bedeutendes immunregulatorisches Molekül angesehen, das auf Granulozyten und Makrophagen in verschiedenen Reifungsstadien Einfluss nimmt (Hamilton, 2002).

### 3.1 Die Bedeutung von GM-CSF für DC

Experimentell kann GM-CSF *in vitro* zur Generierung unreifer DC aus myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark benutzt werden (Inaba et al., 1992). Diese GM-CSF ausdifferenzierten DC können durch inflammatorischen Stimuli wie LPS reifen und produzieren dann proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 und IL-23 (Fleetwood et al., 2007). Die Behandlung der Zellen mit GM-CSF konditioniert die Zellen für proinflammatorische Stimuli. GM-CSF wirkt zusätzlich chemoattraktiv auf Monozyten und Neutrophile (Gomez-Cambronero et al., 2003). Es ist bei myeloiden Zellen wie Monozyten und Makrophagen generell ein wichtiger Überlebensfaktor, erhöht die Proliferation, das Adhäsionsverhalten und die Expression von MHCII *in vitro* (Gamble et al., 1989; Hart et al., 1991; Cheung und Hamilton, 1992; Hamilton, 1993). Damit ist GM-CSF auch unter inflammatorischen Bedingungen ein wichtiger Regulationsfaktor myeloider DC, der sie an ihren Wirkungsort lenkt und auf Aufgaben wie Antigenprozessierung und Präsentation vorbereitet.

### 3.2 Die Bedeutung von GM-CSF für Mikroglia

Als residente, myeloide Zellen hämatopoetischen Ursprungs stellen Mikroglia die zentralen Zielzellen für GM-CSF im ZNS dar. Der Einfluss von GM-CSF auf Mikroglia lässt sich *in vitro* in Primärkulturen aus neonatalen Mausgehirnen untersuchen. So wachsen in Gegenwart von GM-CSF Mikroglia heran, welche funktionell unreifen DC entsprechen (Carson et al., 1998; Santambrogio et al., 2001; Re et al., 2002), die voraktivierte, nicht aber primäre T-Zellen aktivieren können (Fischer und Bielinsky, 1999; Aloisi et al., 2000). GM-CSF differenzierte Mikroglia zeigen nach Stimulation mit löslichem CD40L einen reifen DC-Phänotyp und üben mit der Stimulation naiver T-Zellen eine Hauptfunktion von DC aus (Fischer und Reichmann, 2001). Mikroglia aus neonatalen Gliakulturen sind nicht terminal differenziert. Unter Einfluss von im Gehirn konstitutiv exprimiertem M-CSF differenzieren sie zu Makrophagen (Re et al., 2002). Deshalb werden sie als undifferenzierte Vorgängerzellen im Gehirn beschrieben, die noch nicht terminal ausdifferenziert sind.

Welchen Stellenwert die Anwesenheit von GM-CSF für die Differenzierung von Mikroglia zu DC *in vivo* hat, ist nicht bekannt.

### 3.3 GM-CSF unter inflammatorischen Bedingungen

GM-CSF kann bei inflammatorischen Prozessen abhängig von der Art der Immunreaktionen sowohl schützende als auch schädliche Einflüsse ausüben. Eine Erklärung dafür ist die erhöhte Frequenz myeloider Zellen in GM-CSF behandelten Mäusen. GM-CSF führt zu einer Mobilisierung dieser Zellen aus dem Knochenmark ins Blut und aktiviert die Zellen, so dass sie *in vitro* stärker auf inflammatorische Stimuli wie LPS reagieren (Hamilton, 2008).

Bei Kollagen-induzierter Arthritis, einem Mausmodell für rheumatoide Arthritis, steht die Schwere der Erkrankung in direkter Korrelation mit der Anzahl myeloider Zellen in den Gelenken. Die Gabe von GM-CSF verstärkt den Verlauf der Krankheit (Campbell et al., 1997). GM-CSF defiziente Mäuse hingegen sind resistent gegenüber der Induktion von Kollagen-induzierter Arthritis (Campbell et al., 1998a).

Auch bei inflammatorischen Prozessen im ZNS kann GM-CSF den Verlauf verstärken. Bei Alzheimer und auch in der akuten Phase von MS ist die Expression von GM-CSF im ZNS und im Liquor erhöht (Tarkowski et al., 1997; Carrieri et al., 1998; Tarkowski et al., 2001). In GM-CSF defizienten Mäusen lässt sich keine EAE auslösen (McQualter et al., 2001). Im Gegensatz dazu sorgt die lokale Gabe von GM-CSF über retroviral transduzierte T-Zellen, die GM-CSF produzieren, für einen schnelleren Verlauf der EAE (Marusic et al., 2002). In diesen Fällen verschlechtert also GM-CSF den Verlauf des experimentellen Modells.

Allerdings sind auch viele Beispiele bekannt, bei denen GM-CSF einen positiven Einfluss auf die Inflammation hat. Unter anderem wirkt GM-CSF auf Mikroglia, indem es sie aktiviert, sie morphologisch verändert und die Proliferation *in vitro* erhöht (Schermer und Humpel, 2002). GM-CSF aktivierte Mikroglia sind phagozytisch aktiv und können durch die Entfernung von Zell- und Myelinresten die ZNS- Homöostase schneller wieder herstellen (Brook et al., 1998; Franzen et al., 1998). Die für Mikroglia gezeigte Phagozytose apoptotischer Zellen kann deren Zytokinprofil verändern und somit der Inflammation entgegenwirken (Magnus et al., 2001). Bei Verletzung des Rückenmarks zeigt die Behandlung mit GM-CSF im Tiermodell eine schnellere Wiederherstellung der BHS und weniger Apoptose im Rückenmark (Ha et al., 2005). *In vitro* hat GM-CSF eine neurotrophe Funktion und stimuliert das Neuritenwachstum (Kannan et al., 2000). Nach Verletzungen des ZNS kommt es im Gehirn zur Astrogliose, in der reaktive Astrozyten und Mikroglia die sogenannte Glianarbe bilden, die die axonale Regeneration und die Neubildung von Synapsen verhindert. GM-CSF verändert die Zusammensetzung der Glianarbe, indem es in

Mikroglia die Phagozytose von Zellresten steigert, und beeinflusst so Überleben und Funktion der umgebenen Neurone (Giulian et al., 1994). Auch in der frühen Phase nach einer zerebralen Ischämie sind erhöhte Mengen von GM-CSF zu finden (Tarkowski et al., 1997; Kleinschnitz et al., 2004). In den experimentellen Modellen für Schlaganfall wie beim Verschluss der *Arteria media cerebri* verhindert die Administration von GM-CSF die Apoptose und verkleinert die Infarktgröße (Nakagawa et al., 2006; Schabitz et al., 2008). Dies ist bedingt durch die Mobilisierung myeloider Zellen aus dem Knochenmark und das vermehrte Auftreten von DC in der Penumbra (Li et al., 2001). Auch ein langfristiger Effekt von GM-CSF in Form der Förderung der Arteriogenese nach dem Infarkt ist beschrieben (Buschmann et al., 2003; Schneeloch et al., 2004).

Der Einsatz von GM-CSF Blockade durch spezifische Antikörper gegen GM-CSF und den Rezeptor wird mittlerweile in klinischen Studien getestet. Diese wird angewendet bei Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Autoimmunerkrankungen und verschiedenen Krebserkrankungen (Hamilton, 2008).

#### 4 Zielsetzung der Arbeit

GM-CSF ist zum einen ein gut beschriebener hämatopoetischer Wachstumsfaktor, zum anderen aber auch ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin. Auch im ZNS wird GM-CSF unter inflammatorischen Bedingungen bei vielen Erkrankungen gebildet. In der Regel werden dabei gleichzeitig eine ganze Reihe anderer proinflammatorischer Mediatoren freigesetzt. Bei einer infektiösen Enzephalitis wirken darüber hinaus auch mikrobielle Produkte immunstimulatorisch. Bei vielen neuroinflammatorischen Erkrankungen sind mit der Entstehung von GM-CSF auch DC im Gehirn zu finden. DC gelten als wichtigste Population Antigen präsentierender Zellen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Initiierung der Immunreaktion auch im ansonsten immunprivilegierten ZNS.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung von GM-CSF auf DC im ZNS *in vitro* und *in vivo* analysiert werden. Mikroglia entwickeln sich unter der Einwirkung von GM-CSF *in vitro* phänotypisch und morphologisch zu unreifen DC, die mittels geeigneter Stimuli weiter zu reifen DC ausdifferenziert werden können. Nicht eindeutig geklärt war bisher, inwieweit diese hirnresidenten DC-Vorläuferzellen auch die wichtigste Funktion der DC übernehmen können – die Präsentation von Antigen und die Aktivierung naiver T-Zellen. Obwohl es vereinzelt Studien zu einzelnen Mausstämmen gibt, war bisher nicht bekannt, inwieweit es bei Mikroglia verschiedener Mausstämme spezifische Unterschiede gibt. Deshalb wurden im ersten Teil dieser Arbeit Mikroglia *in vitro* von BALB/c und C57BL/6 Mäusen phänotypisch und funktionell charakterisiert.

Es ist schon lange bekannt, dass GM-CSF im Gehirn - genauso wie DC - nur unter inflammatorischen Bedingungen zu finden ist. Allerdings gab es keine Hinweise darauf, inwieweit die alleinige Gabe von GM-CSF die Anwesenheit von ZNS-DC auch ohne weitere inflammatorische Stimuli induzieren kann. Dabei sind für die ZNS-DC zwei mögliche Ursprünge denkbar. Zum einen kann GM-CSF auf hirnresidente Mikroglia wirken, und durch den *in vitro* beschriebenen Wirkmechanismus die Entwicklung von CD11c<sup>+</sup> Mikroglia begünstigen. Zum anderen ist GM-CSF bekannt als chemoattraktives Zytokin für myeloide Zellen, und so ist ebenfalls denkbar, dass GM-CSF die Rekrutierung von DC oder deren Vorläuferzellen ins Gehirn trotz der soliden Barriere der BHS induzieren kann. Die Frage war daher, ob die alleinige Applikation von GM-CSF im Gehirn ausreichend ist, um die Anwesenheit von DC zu induzieren. Dazu wurden gesunde Mäuse i.c.v. mit GM-CSF behandelt und die Veränderungen der Leukozytenpopulationen im ZNS analysiert.



## II Ergebnisse

### 1 Effekt von GM-CSF auf Mikroglia *in vitro*

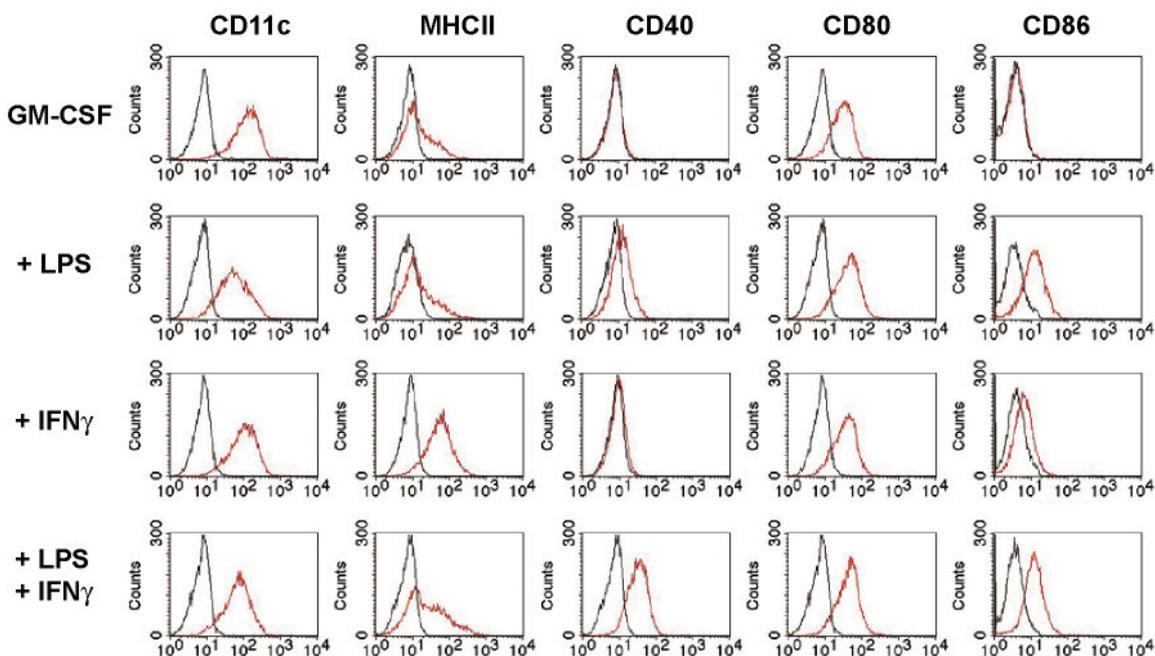
In Primärkulturen neonataler Hirnzellen entwickeln sich unter dem Einfluß von GM-CSF Mikroglia, die eine dendritische Morphologie aufweisen und phänotypisch unreifen DC gleichen (Re et al., 2002). Sowohl ZNS-DC, die bei infektiöser Enzephalitis aus dem Gehirn von BALB/c (B/c) Mäusen isoliert werden, als auch GM-CSF differenzierte BALB/c Mikroglia, sind in der Lage, T-Zellen zu aktivieren (Fischer und Reichmann, 2001). Dagegen weisen ZNS-DC aus C57BL/6 (BL6) Mäusen mit autoimmuner Enzephalitis eine T-Zell-inhibitorische Wirkung auf (Suter et al., 2003). Diese Befunde könnten auf einen stammabhängigen funktionellen Unterschied von ZNS-DC hindeuten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden deshalb GM-CSF differenzierte Mikroglia aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen zunächst hinsichtlich der exprimierten DC-Marker und der Expression kostimulatorischer Moleküle verglichen. Um Mikroglia *in vitro* zu kultivieren, wurden neonatale Gliakulturen verwendet. Dabei wurden die aus den Kortexhälften neugeborener Mäuse gewonnenen Zellen zehn Tage kultiviert (V.6.1). Der konfluente Zellmonolayer, der vor allem aus Astrozyten besteht, wurde mit GM-CSF supplementiertem Medium weiterkultiviert. In dieser Zeit proliferierten Mikroglia und konnten nach ein bis zwei Wochen in eine Sekundärkultur umgesetzt werden (V.6.2). Die Mikroglia waren zu diesem Zeitpunkt zu einem geringen Anteil positiv für den DC spezifischen Marker CD11c (Daten nicht gezeigt). Für die anschließende Kultivierung in der Sekundärkultur wurden die Mikroglia durch vorsichtiges Abspülen von dem Astrozytenmonolayer getrennt und alleine für weitere ein bis zwei Wochen in Anwesenheit von GM-CSF in Kultur gehalten. In dieser Zeit erhöhte sich zusätzlich die CD11c Expression der Mikroglia. In dieser Arbeit wurden die Mikroglia ausschließlich aus Sekundärkulturen verwendet.

#### 1.1 Charakterisierung von BALB/c Mikroglia

Mikroglia aus Sekundärkultur sind aufgrund der Expression von CD11b und CD11c myeloiden DC vergleichbar (Fischer und Reichmann, 2001). Zunächst wurden Mikroglia aus BALB/c Mäusen darauf getestet, inwieweit sie phänotypisch und funktionell mit DC übereinstimmen. Unreife DC sind durch die Reifung mit LPS oder/und IFN $\gamma$  so stimulierbar, daß sie die MHCII Expression auf der Oberfläche erhöhen und kostimulatorische Liganden wie CD40, CD80 und CD86

hochregulieren (Banchereau und Steinman, 1998). Daher wurden Mikroglia hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression kostimulatorischer Liganden und MHCII nach unterschiedlichen Stimulationen untersucht (Abb.1).

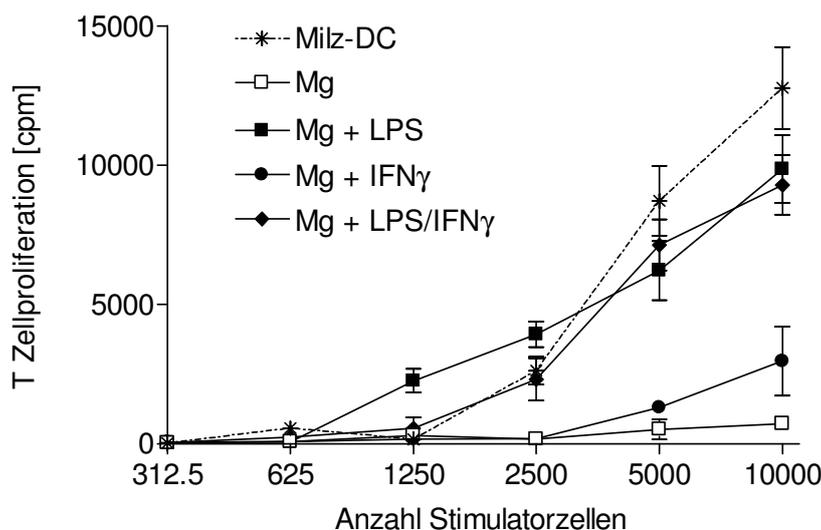
BALB/c Mikroglia aus der Sekundärkultur waren zu 100% positiv für den DC-Marker CD11c. Die basale Expression von MHCII war nur auf einigen Mikroglia zu beobachten und die Zellen zeigten keine Expression von CD40 und CD86. Außerdem wiesen Mikroglia in Sekundärkultur eine basale Expression von CD80 auf. Während die Stimulation mit LPS eine vermehrte Expression von CD40 und vor allem CD86 induzierte, blieb die Expression von CD11c, CD80 und MHCII unbeeinflusst. Die Stimulation mit IFN $\gamma$  hingegen erhöhte fast ausschließlich die MHCII Expression. Nach IFN $\gamma$  Stimulation waren alle Mikroglia MHCII positiv, die anderen untersuchten Oberflächenmoleküle waren nicht beeinflusst. Wurden die Mikroglia mit IFN $\gamma$  und LPS gleichzeitig stimuliert, war die CD40 Induktion am höchsten. Zusätzlich wiesen diese Zellen eine marginale Hochregulation der MHCII Oberflächenexpression auf und waren positiv für CD80 und CD86. Unabhängig von der Art der Stimulation blieben die Zellen CD11c positiv. Zusammenfassend ist der basale Phänotyp GM-CSF differenzierter Mikroglia mit unreifen DC vergleichbar. Diese können durch geeignete Stimuli so aktiviert werden, dass sie die phänotypischen Charakteristika reifer DC annehmen.



**Abb. 1: DC-ähnlicher Phänotyp von GM-CSF differenzierten Mikroglia aus BALB/c Mäusen**

BALB/c Mikroglia aus Sekundärkultur wurde unstimuliert eingesetzt, oder für 24h mit LPS (1 $\mu$ g/ml), IFN $\gamma$  (1000U/ml) oder beidem stimuliert und im Durchflusszytometer für die angegebenen Oberflächenmarker analysiert (rote Linie). Isotypkontrollen sind mit schwarzer Linie dargestellt.

Eine weitere definierende Eigenschaft reifer DC ist es, naive T-Zellen aktivieren zu können. Dies kann in einem allogenen Lymphozytenreaktionstest („mixed leukocyte reaction“, MLR) getestet werden. Dazu wurden als Antigenpräsentierende Zellen (APC) verschieden stimulierte Mikroglia in unterschiedlichen Konzentrationen mit allogenen T-Zellen kokultiviert. Als Vergleich wurden DC *ex vivo* mittels CD11c-beads aus BALB/c-Milzen aufgereinigt. Durch die Kontroll-APC wurde eine starke T-Zellantwort hervorgerufen, die mindestens 2500 Stimulatorzellen benötigte (Abb. 2). Eine vergleichbar starke Proliferation wurde durch LPS und LPS+IFN $\gamma$  stimulierte Mikroglia induziert, bei LPS stimulierten Mikroglia reichten bereits 1250 Zellen um eine T-Zellproliferation zu induzieren. Unstimulierte GM-CSF differenzierte Mikroglia hingegen sind nicht in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren und auch die alleinige Stimulation mit IFN $\gamma$  sorgt nur für eine sehr schwache T-Zellproliferation. Mit den geeigneten Stimulationsbedingungen sind BALB/c Mikroglia in der Lage, die gleiche Funktion zu erfüllen wie reife DC.

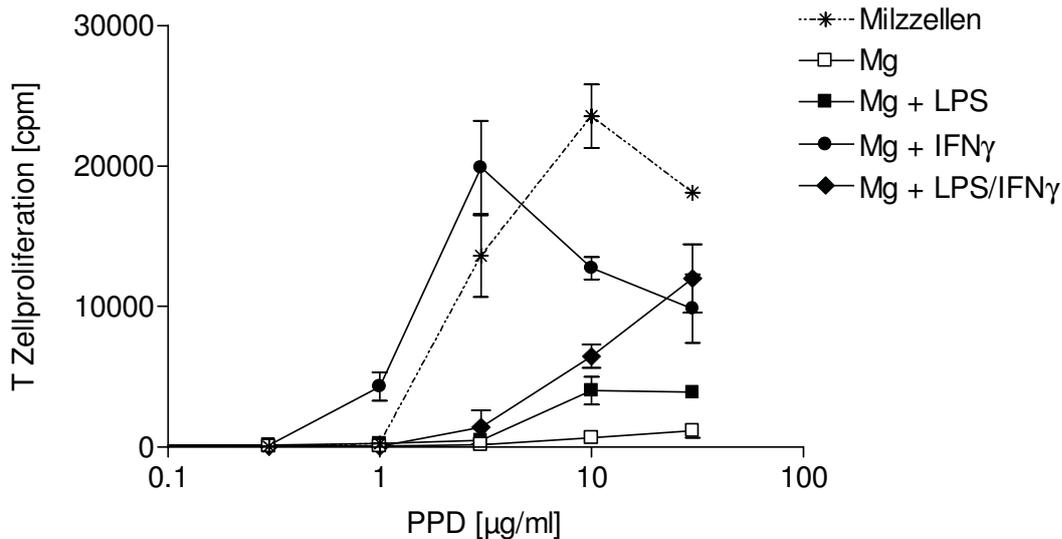


**Abb. 2: Allostimulatorische Kapazität GM-CSF differenzierter Mikroglia aus BALB/c Mäusen**

GM-CSF differenzierte Mikroglia (Mg) aus BALB/c Mäusen wurden ohne bzw. nach zusätzlicher LPS oder/und IFN $\gamma$  Reifung als Stimulatorzellen in einer MLR für allogene C57BL/6 T-Zellen eingesetzt. Als Kontroll-APC wurden Milz-DC aus BALB/c Mäusen verwendet. Die Messung der T-Zellproliferation erfolgte über den Einbau von radioaktiv markierter  $^3\text{H}$ -Thymidindesoxyribose (TdR).

Naive T-Zellen benötigen im Gegensatz zu vorab aktivierten T-Zellen deutlich mehr kostimulatorische Signale. Deshalb wurde der aus BALB/c-Mäusen abstammende T-Zellklon LNC.2 ebenfalls auf seine Aktivierbarkeit durch unterschiedlich stimulierten Mikroglia getestet (Abb.3). Dazu wurde PPD, das LNC.2 spezifische Antigen Tuberkulin, titriert und in Anwesenheit

von APC mit den T-Zellen kokultiviert. In Anwesenheit von Kontroll-APC lag das Optimum der Antigenkonzentration für eine starke T-Zellproliferation bei 10 µg/ml. Bei IFN $\gamma$  stimulierten Mikroglia reichte bereits eine PPD Konzentration von 3 µg/ml aus, um die T-Zellen effizient zu aktivieren. Andere Stimulationen der Mikroglia hingegen reichten nicht aus, um die T-Zellen ausreichend zu aktivieren. Hier war auch mit der höchsten PPD-Konzentration nur eine geringe T-Zellproliferation zu beobachten.



**Abb. 3: Stimulatorische Aktivität GM-CSF differenzierter BALB/c Mikroglia auf geprimte T-Zellen**

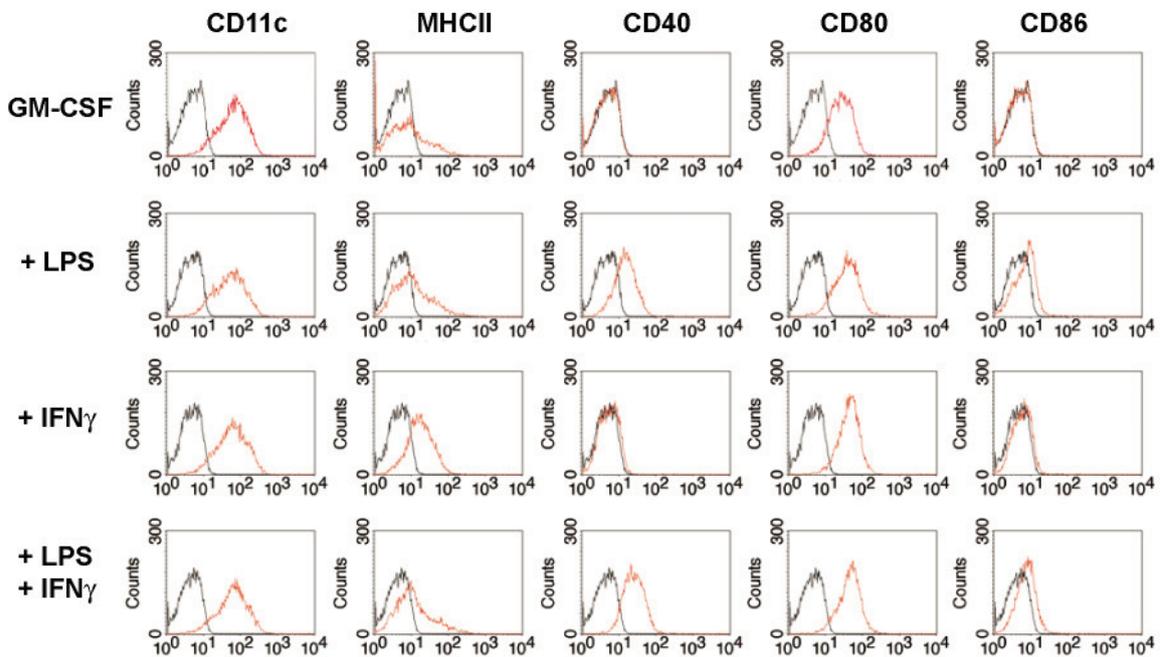
GM-CSF differenzierte Mikroglia wurden ohne bzw. nach zusätzlicher LPS oder/und IFN $\gamma$  Reifung als Stimulatorzellen in der T-Zellproliferation des Klons LNC.2 und PPD in den angegebenen Konzentrationen kultiviert. Die T-Zellproliferation wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem  $^3\text{H}$ -TdR gemessen.

Mikroglia aus BALB/c Mäusen zeigen also nicht nur die phänotypischen Eigenschaften reifer DC, sondern teilen auch funktionell deren wichtigste Eigenschaften, sie können naive und geprimte T-Zellen aktivieren.

### 1.2 Charakterisierung von C57BL/6 Mikroglia

Ebenso wie es zuvor für BALB/c Mikroglia beschrieben wurde, wurden im folgenden Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen untersucht werden. Bei der Kultur der Mikroglia wurden im Vergleich zu BALB/c Mikroglia keine nennenswerten Unterschiede festgestellt. Die Mikroglia verhielten sich im Bezug auf GM-CSF stimulierte Proliferation und auch der anschließenden Proliferation und Kultivierbarkeit in Sekundärkultur ebenso wie die zuvor beschriebenen BALB/c Mikroglia. Zur

phänotypischen Analyse wurden zunächst erneut die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Liganden und MHCII mittels FACS-Analyse untersucht.

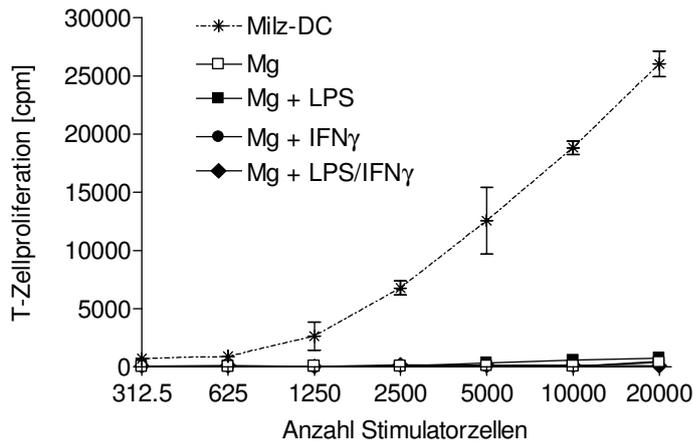


**Abb. 4: DC-ähnlicher Phänotyp von GM-CSF differenzierten Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen**

C57BL/6 Mikroglia aus Sekundärkultur wurde unstimuliert eingesetzt, oder für 24h mit LPS (1µg/ml), IFN $\gamma$  (1000U/ml) oder beidem stimuliert und im Durchflusszytometer für die angegebenen Oberflächenmarker analysiert.

Wie auch bei der Oberflächenexpressionsanalyse der BALB/c Mäuse wurden für die phänotypische Charakterisierung der C57BL/6 Mikroglia die Reifungsmarker CD40, CD80, CD86 und MHCII analysiert (Abb. 4). Ebenso wie bei der Analyse der BALB/c Mikroglia bewirkte die Stimulation mit LPS einen leichten Expressionsanstieg von CD86 und CD40. Die alleinige Stimulation mit IFN $\gamma$  bewirkte, dass nahezu alle Mikroglia MHCII exprimierten. Die gleichzeitige Stimulation von LPS und IFN $\gamma$  bedingte die deutlichste Zunahme von CD40, und auch die Expression von CD86 nahm zu. Allerdings waren im Vergleich zur alleinigen IFN $\gamma$  Stimulation deutlich weniger Mikroglia positiv für MHCII. Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen blieben durch die verschiedenen Stimulationsbedingungen unbeeinflusst in ihrer CD11c Expression, auch sie war bei den C57BL/6 Mäusen vergleichbar hoch wie bei den zuvor beschriebenen BALB/c Mäusen. Zusammenfassend lässt sich also die Oberflächenexpression von CD11c und den kostimulatorischen Liganden auf C57BL/6 Mikroglia mit der von BALB/c Mikroglia vergleichen.

Im nächsten Schritt wurden die C57BL/6 Mikroglia auf ihre allostimulatorische Aktivität hin untersucht werden. In Abb. 5 ist der Vergleich mit C57BL/6 Milz-DC zu sehen.



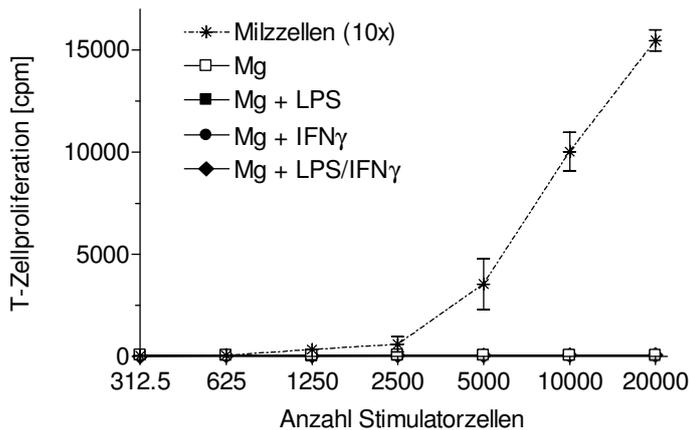
**Abb. 5: Keine stimulatorische Aktivität für naive T-Zellen von Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen**

GM-CSF differenzierte Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen wurden ohne bzw. nach zusätzlicher LPS oder/und IFN $\gamma$  Reifung als Stimulatorzellen in einer MLR für allogene BALB/c T-Zellen eingesetzt. Als Kontroll-APC wurden Milz-DC aus C57BL/6 Mäusen verwendet. Die Messung der T-Zellproliferation erfolgte über den Einbau von radioaktiv markiertem  $^3\text{H}$ -TdR.

Wie auch in Abb. 2 dargestellt, induzieren C57BL/6 Milz-DC eine starke Proliferation allogener BALB/c T-Zellen. Überraschenderweise ließ sich die Proliferation aber nicht durch Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen stimulieren. Keine der eingesetzten Stimulationsbedingungen konnte Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen so aktivieren, das eine allogene T-Zellproliferation messbar war. Unabhängig von der Stimulation durch LPS oder/und IFN $\gamma$  sind C57BL/6 Mikroglia also nicht in der Lage, die nötigen Signale zu liefern um naive T-Zellen zur Proliferation zu bringen.

Wie bereits erwähnt benötigen naive T-Zellen im Gegensatz zu vorab aktivierten T-Zellen mehr kostimulatorische Signale. Im Folgenden wurde deshalb analog getestet, ob Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen zur Stimulation geprimter T-Zellen in der Lage sind.

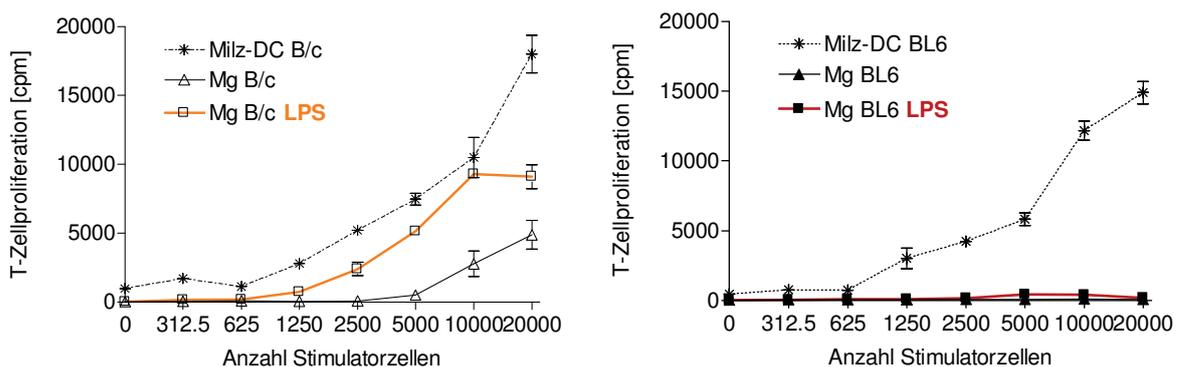
Dazu wurde der T-Zellklon 4Tx12 genutzt. Dieser T-Zellklon wurde aus einer Toxoplasmen infizierten Maus generiert und erkennt ein H-2<sup>b</sup>-restringiertes Antigen aus Toxoplasma lysat (TLA) (Reichmann et al., 1997). Deshalb wurden unterschiedlich stimulierte Mikroglia und Milzzellen als Kontrolle mit TLA kultiviert. Der T-Zellklon 4Tx12 zeigte in Kokultur mit den Kontroll-APC eine starke Proliferation (Abb. 6), jedoch war mit keiner der stimulierten Mikroglia eine Proliferation zu beobachten. Auch im Test mit geprimten T-Zellen waren Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen nicht in der Lage, als APC zu agieren.



**Abb. 6: Keine stimulatorische Aktivität von Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen für geprimte T-Zellen**

GM-CSF differenzierte Mikroglia wurden ohne bzw. nach zusätzlicher LPS oder/und IFN $\gamma$  Reifung als Stimulatorzellen in der T-Zellproliferation mit dem Klon 4Tx12 und 10  $\mu$ g/ml TLA kultiviert und die T-Zellproliferation über den Einbau von radioaktiv markiertem  $^3$ H-TdR gemessen. Als Kontrollzellen dienten Milzgesamtzellen in der 10-fachen auf der x-Achse angegebenen Menge.

Ein Erklärungsversuch für die Diskrepanz zwischen Mikroglia aus BALB/c und C57BL/6 könnte die unterschiedliche Reaktivierbarkeit von BALB/c und C57BL/6 Mäusen durch Mausstamm spezifische Unterschiede innerhalb der T-Zellen sein. Um die Ursache zu untersuchen, wurden im Folgenden Mikroglia beider Mausstämme in einer MLR mit T-Zellen aus dem gleichen Responder-Mausstamm (FVB) kokultiviert. Hier sollten in beiden Fällen die T-Zellen aufgrund eines anderen MHCII-Haplotyp (H-2q) in einem allogenen Test reagieren (Abb.7).

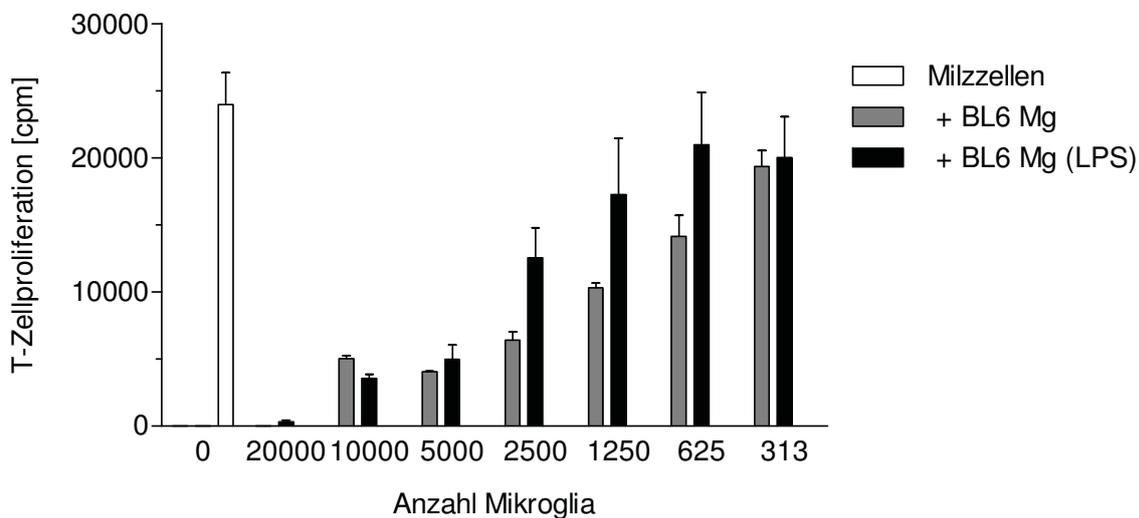


**Abb. 7: Vergleich der allostimulatorischen Kapazität von Mikroglia aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen gegenüber naiven T-Zellen aus FVB-Mäusen**

GM-CSF differenzierte Mikroglia aus BALB/c (links) oder C57BL/6 (rechts) Mäusen wurden ohne bzw. nach zusätzlicher LPS-Reifung als Stimulatorzellen in einer MLR für allogene FVB T-Zellen eingesetzt. Als Kontroll-APC wurden Milz-DC aus B/c und BL6 Mäusen verwendet. Die Messung der T-Zellproliferation erfolgte über den Einbau von radioaktiv markiertem  $^3$ H-TdR.

Bei T-Zellen aus FVB Mäusen war sowohl durch die Stimulation mit Milz-DC aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen eine vergleichbare Proliferation zu sehen. Auch Mikroglia aus BALB/c Mäusen induzierten eine Stimulation von FVB T-Zellen. Vergleichbar zu den Ergebnissen in Abb. 2 war die Proliferation mit LPS stimulierter Mikroglia größer als mit unstimulierter Mikroglia und damit vergleichbar mit der Induktion durch Kontroll-APC. Bei den verwendeten C57BL/6 Mikroglia hingegen wurde unabhängig von Ihrer Stimulation keine Proliferation der FVB T-Zellen induziert.

Wenn APC keine T-Zell-stimulatorische Funktion übernehmen, kann man daraus resultierend die Frage stellen, ob sie eine inhibitorische Funktion ausüben. Dies kann getestet werden, indem Mikroglia zeitgleich mit T-Zellen und T-Zell-aktivierenden APC kokultiviert werden (Abb.8).



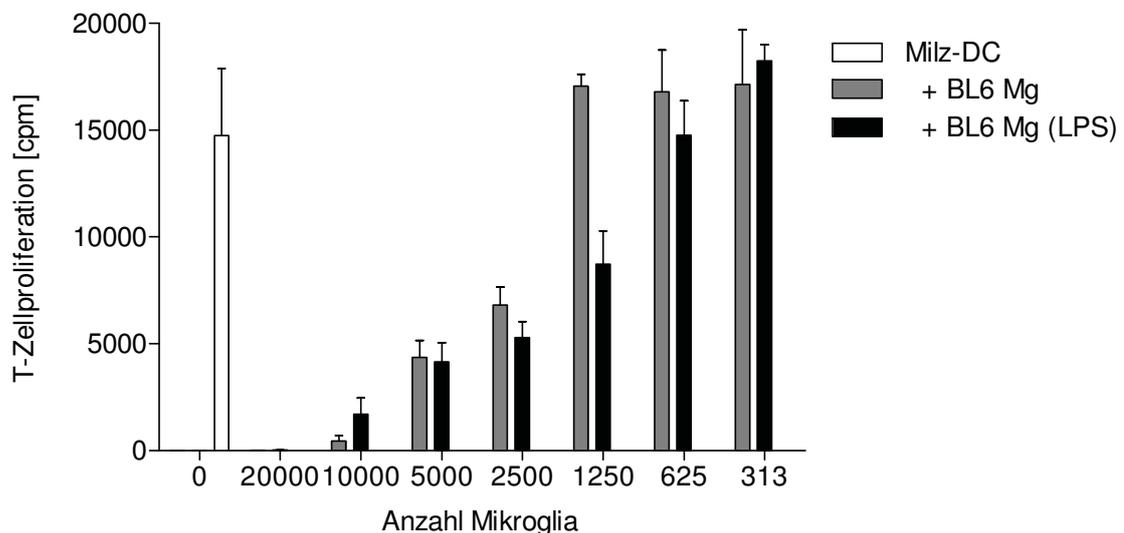
**Abb. 8: Hemmung der T-Zellaktivierung eines T-Zellklons durch C57BL/6 Mikroglia**

In einem T-Zellproliferationstest wurden pro well  $10^6$  bestrahlte APC aus BL6 Mäusen mit  $2 \times 10^4$  4Tx12 T-Zellen und  $10 \mu\text{g/ml}$  TLA kokultiviert (weißer Balken). Den Kulturen wurden GM-CSF differenzierte BL6 Mikroglia (grau) bzw. LPS gereifte BL6 Mikroglia (schwarz) wie angegeben zugesetzt. Die Messung der T-Zellproliferation erfolgte über den Einbau von radioaktiv markiertem  $^3\text{H-TdR}$ .

Mit 100.000 Milzzellen und  $10 \mu\text{g}$  TLA proliferierte der T-Zellklon 4TX12 deutlich (weißer Balken). Wurden allerdings Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen unterschiedlich stimuliert hinzugegeben, so konnte die Proliferation bei der höchsten Zellzahl der Mikroglia (20000/well) völlig inhibiert werden. Lediglich bei einer Zellzahl kleiner als 625 Mikroglia/well konnte die Proliferation des T-Zellklons ungehindert ablaufen. Dabei spielte die Stimulation der Mikroglia nahezu keine Rolle. LPS stimulierte Mikroglia (schwarze Balken) inhibierten bei den mittleren Zellzahlen unwesentlich geringer als GM-CSF differenzierte Mikroglia (graue Balken), der

Unterschied war nicht signifikant. C57BL/6 Mikroglia inhibieren also unabhängig von deren Stimulation die Proliferation voraktiver T-Zellen induziert durch Milz-APC.

Ebenfalls getestet wurde der Einfluß von Mikroglia auf die Proliferation naiver T-Zellen (Abb. 9). Auch hier wurde durch die Stimulation mit Milz-DC in Abwesenheit der Mikroglia eine deutliche T-Zellproliferation induziert (weißer Balken). Wurde allerdings eine zunehmende Zahl Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen kokultiviert, war die Proliferation naiver T-Zellen deutlich reduziert. Bei 20.000 Mikroglia/well war die Proliferation vollständig unterdrückt. Erneut war die Inhibition der Proliferation unabhängig vom Reifungsstatus der Mikroglia zu beobachten, sowohl unstimulierte als auch LPS stimulierte Mikroglia hatten einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt auf die Proliferation naiver T-Zellen.

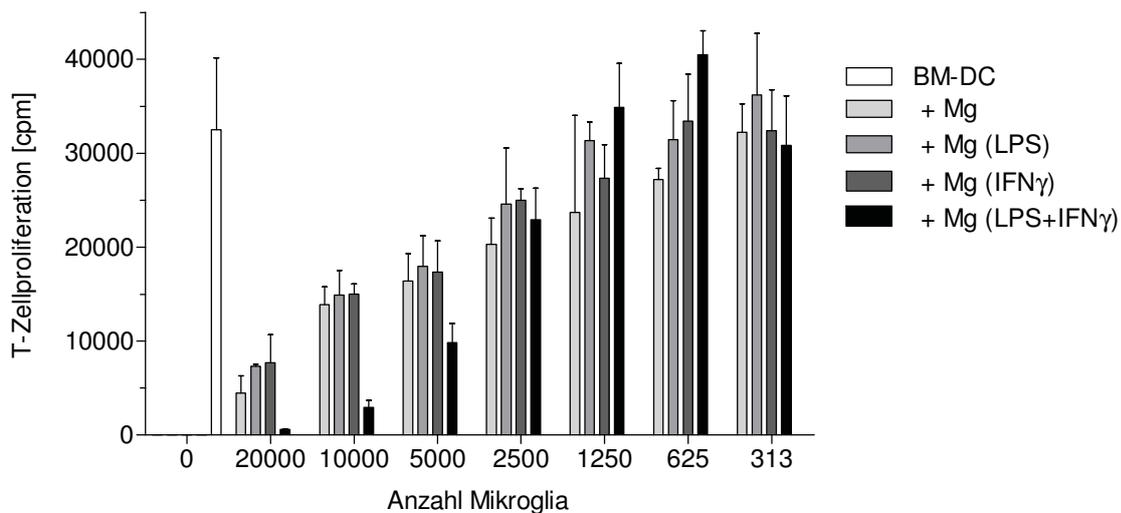


**Abb. 9: Hemmung der Proliferation naiver T-Zellen durch C57BL/6 Mikroglia: Milz-DC als APC**

In einer MLR wurden pro well 5000 Milz-DC aus BL6 Mäusen mit  $10^5$  allogenen B/c T-Zellen kokultiviert (weißer Balken). Den Kulturen wurden GM-CSF differenzierte BL6 Mikroglia (grau) bzw. LPS-gereifte B6 Mikroglia (schwarz) wie angegeben zugesetzt. Die Messung der T-Zellproliferation erfolgte über den Einbau von radioaktiv markiertem  $^3\text{H}$ -TdR.

Weiter wurde getestet, inwieweit die inhibitorischen Eigenschaften der C57BL/6 Mikroglia abhängig sind von den die T-Zellproliferation induzierenden APC. Neben Milz-DC und anderen APC wie B-Zellen und Makrophagen in der Milz können auch Knochenmarks-DC (BM-DC) eine allogene T-Zellproliferation bewirken. BM-DC wurden generiert, indem Knochenmarkszellen für 8-10 Tage in Anwesenheit von GM-CSF kultiviert wurden. In einem Proliferationstest wurden allogene naive T-Zellen aus BALB/c Mäusen mit BM-DC aus C57BL/6 Mäusen in Anwesenheit von unterschiedlich stimulierten Mikroglia kokultiviert (Abb.10). In Abwesenheit der Mikroglia

waren auch BM-DC in der Lage, eine deutliche T-Zellproliferation zu induzieren (weißer Balken). Wurden allerdings die unterschiedlich stimulierten Mikroglia in Kokultur eingesetzt, konnte die Proliferation der T-Zellen bei höchster Mikrogliazahl bis auf ca. 10% der Ausgangsproliferation reduziert werden (Abb.10). In Anwesenheit LPS+IFN $\gamma$  stimulierter Mikroglia wurde die T-Zellproliferation völlig unterdrückt. Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen inhibieren also auch die BM-DC induzierte T-Zellproliferation relativ unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus.



**Abb. 10: Hemmung der Proliferation naiver T-Zellen durch C57BL/6 Mikroglia: BM-DC als APC**

In einer MLR wurden pro well 2500 BM-DC aus C57BL/6 Mäusen mit 10<sup>5</sup> allogenen BALB/c T-Zellen kokultiviert (weißer Balken). Den Kulturen wurden GM-CSF differenzierte C57BL/6 Mikroglia (hellgrau), LPS (grau), IFN $\gamma$  (dunkelgrau) oder LPS + IFN $\gamma$  (schwarz) stimulierter C57BL/6 Mikroglia wie angegeben zugesetzt. Die Messung der T-Zellproliferation erfolgte über den Einbau von radioaktiv markiertem <sup>3</sup>H-TdR.

In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass bei Mikroglia aus neonataler Gliakultur zwischen zwei verschiedenen Mausstämmen deutliche Unterschiede in Aktivierungs- und Inhibierungspotenzial von verschiedenen T-Zellpopulationen bestehen. Während Mikroglia aus BALB/c Mäusen deutlich T-Zell-stimulatorische Eigenschaften besaßen, konnten Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen keine T-Zellproliferation induzieren. Im Gegenteil: die Proliferation getesteter T-Zellen ließ sich unabhängig von den verwendeten APC in Anwesenheit von GM-CSF differenzierter oder unterschiedlich stimulierten Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen deutlich hemmen. Die Frage war nun, wie sich Mikroglia anderer Mausstämmen verhalten, deshalb wurden Mikroglia aus Mäusen mit unterschiedlichen MHC Haplotypen untersucht.

Dazu wurden unterschiedliche Mausstämme in Bezug auf ihre Generierbarkeit von CD11c<sup>+</sup> Mikroglia, deren stimulatorische Kapazität und der Inhibition in der MLR getestet und mit BALB/c bzw. C57BL/6 Mikroglia verglichen (Tabelle 1).

Mikroglia	B/c	BL6	129	FVB	C3H	F1
GM-CSF abhängige Proliferation	+	+	+	+	-	+
Stimulatorische Kapazität	+	-	-	-	n.d.	-
Inhibitorische Kapazität	-	+	+	-	n.d.	+/-

**Tabelle 1: Funktion GM-CSF differenzierter Mikroglia unterscheidet sich abhängig vom Mausstamm**

In der angegebenen Tabelle wurden weitere Inzucht-Mausstämme mit den Mikroglia der oben charakterisierten Mausstämme verglichen. Getestet wurden die Mikroglia in Bezug auf GM-CSF stimuliertes Wachstum der Mikroglia, Stimulation in der MLR und Inhibition in der MLR (n.d. = nicht detektierbar).

In einer neonatalen Gliakultur des Mausstamms 129 induzierte GM-CSF ebenfalls Mikrogliawachstum. Diese Mikroglia waren jedoch nicht in der Lage, eine allogene T-Zellantwort zu induzieren. Wie für C57BL/6 Mikroglia beschrieben, zeigten auch sie deutlich inhibitorische Eigenschaften und reduzierten die Proliferation allogener T-Zellen aus Mäusen des Stamms FVB um 90-95 %.

Mikroglia aus Neugeborenen des Stamms FVB ließen sich mit GM-CSF differenzieren, zeigten aber weder stimulatorische noch inhibitorische Kapazität im Test mit allogenen Zellen aus Mäusen des Stammes 129 bzw. BALB/c.

Mikroglia vom Stamm C3H waren aus der neonatalen Gliakultur nicht generierbar. Auch höhere GM-CSF Konzentrationen induzierten kein Wachstum der C3H Mikroglia, obwohl der Monolayer aus Astrozyten vergleichbar schnell proliferierte wie bei anderen untersuchten Mausstämmen. Über die stimulatorischen und inhibitorischen Eigenschaften der C3H Mikroglia lässt sich daher keine Aussage treffen.

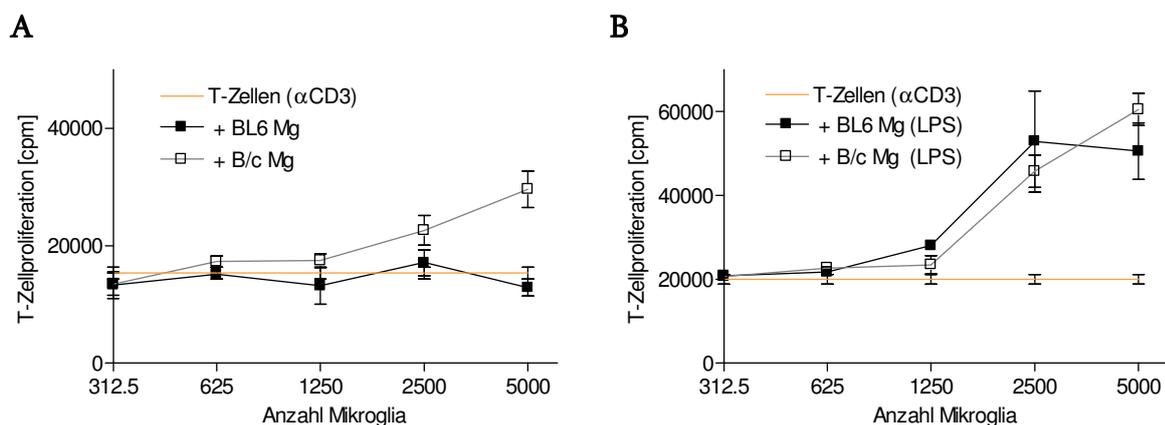
Anschließend sollte geklärt werden, ob der stimulatorische Phänotyp der BALB/c Mikroglia oder der inhibitorische der C57BL/6 Mikroglia der dominante ist. Dazu wurden BALB/c und C57BL/6 Mäuse gekreuzt und die Neugeborenen der ersten Generation (F1) zur Generierung von Mikroglia verwendet. F1 Mikroglia wiesen in der MLR keine T-Zellstimulatorische Aktivität auf. In der MLR konnte allerdings auch bei 20000 Mikroglia im well keine absolute Hemmung erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Die stärkste Inhibition der T-Zellen schwankte innerhalb der drei

Experimente zwischen 40% und 60%. In der F1 Generation war somit der Phänotyp der C57BL/6 Mikroglia der dominante.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mikroglia der verschiedenen Mausstämme sehr unterschiedliche phänotypische und funktionelle Eigenschaften aufweisen.

### 1.3 Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften von C57BL/6 Mikroglia

Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen hemmen deutlich die T-Zellproliferation. Wie zuvor gesehen, ist dies unabhängig von den eingesetzten APC-Populationen wie Milz-DC und BM-DC und ist sowohl mit naiven T-Zellen als auch mit geprimten T-Zellen zu beobachten. Für den Mechanismus dieser Hemmung sind zwei unterschiedlichen Szenarien denkbar. Zum einen kann die Hemmung durch direkten Kontakt der C57BL/6 Mikroglia mit den T-Zellen verursacht werden. Zum anderen kann der Mechanismus indirekt über die Hemmung der *ex vivo* stimulierten APC, die die T-Zellen aktivieren, ablaufen. Um zu untersuchen, ob die direkte oder die indirekte Hemmung der T-Zellen für die Mikroglia zutrifft, wurden im folgenden Experiment die T-Zellen APC unabhängig stimuliert. Dazu wurden T-Zellen und Mikroglia in Abwesenheit von stimulatorischen APC mittels Stimulation durch  $\alpha$ CD3-Antikörper kokultiviert (Abb. 11).

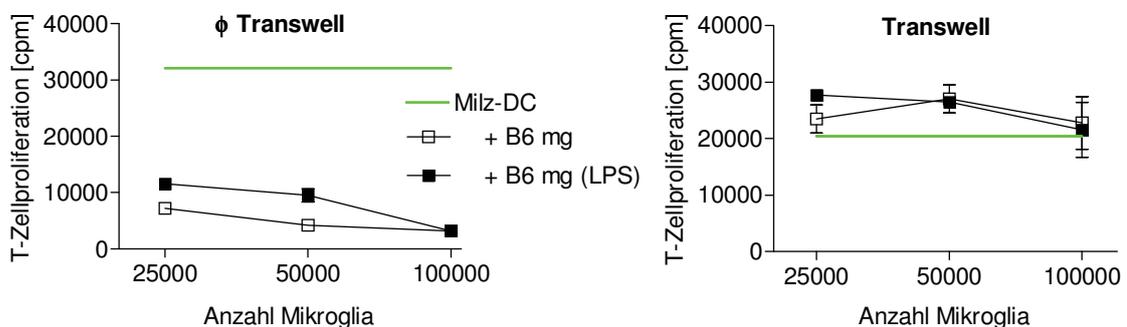


**Abb. 11: APC unabhängige T-Zellproliferation wird nicht durch C57BL/6 Mikroglia inhibiert**

Mikrotiterplatten wurden über Nacht mit  $\alpha$ CD3-Antikörpern beschichtet. Anschließend wurden pro well  $10^5$  B/c T-Zellen in Abwesenheit (orange Linie) oder in Anwesenheit von unstimulierter (A) bzw. LPS-stimulierter (B) BL6 und B/c Mikroglia für 4 Tage inkubiert. Für die letzten 24h wurde radioaktiv markiertes  $^3$ H-TdR zugesetzt.

An eine Multiwellplatte gebundenes  $\alpha$ CD3 vernetzt den T-Zellrezeptor auf der Oberfläche der T-Zellen so stark, dass die T-Zellen auch ohne APC und das gegebenenfalls erforderliche Antigen zur Stimulation gebracht werden. In Abb. 11 wurden T-Zellen in Abwesenheit von GM-CSF differenzierten BALB/c und C57BL/6 Mikroglia durch an die Multiwellplatte gebundenes  $\alpha$ CD3 stimuliert. Die T-Zellen proliferierten in Abwesenheit der Mikroglia deutlich (orange Linie). Wurden die Mikroglia beider Mausstämmen in unterschiedlichen Zellzahlen zu der APC-unabhängigen Proliferation dazugegeben, so wurde die Proliferation auch durch die Anwesenheit von den vorher als inhibitorisch beschriebenen C57BL/6 Mikroglia nicht reduziert. Die Zugabe von LPS stimulierter Mikroglia in Abb. 11B erhöhte sogar noch die T-Zellproliferation, und zwar unabhängig von dem Mausstamm, aus dem die Mikroglia generiert wurden. Es ist also nicht möglich, eine APC-unabhängig induzierte T-Zellproliferation durch die Zugabe von C57BL/6 Mikroglia zu inhibieren. Inhibitorische Mikroglia wirken somit nicht direkt durch die Hemmung der T-Zellen, sondern scheinen die Hemmung durch die Inhibition der APC zu vermitteln, die letztlich die T-Zellen aktiviert.

Die Inhibition von Zellen kann entweder durch direkten Zellkontakt oder durch die Ausschüttung löslicher inhibitorischer Botenstoffe ausgelöst werden. Um den Zellkontakt zu verhindern, wurde der inhibitorische Test in einem Transwell durchgeführt. Dazu wurden die Mikroglia wie bisher beschrieben im direkten Zellkontakt mit den APC zu den T-Zellen gegeben, oder sie wurden im Transwell kokultiviert. Das Transwell lässt durch seine Porengröße von 0,4  $\mu$ m den Austausch von löslichen Stoffen zwar zu, verhindert allerdings den direkten Zellkontakt.

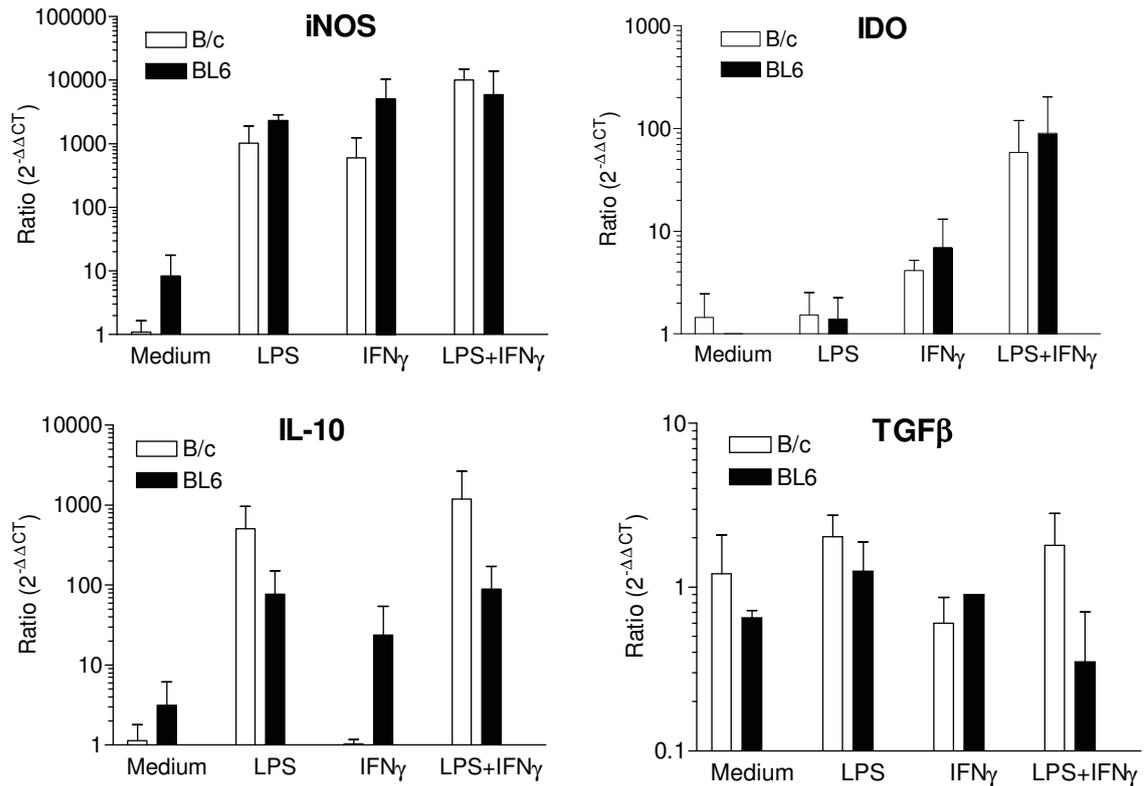


**Abb. 12: Hemmung der T-Zellproliferation durch Mikroglia ist Zellkontakt-abhängig**

In einer 24-well Platte wurden 7500 B6 Milz-DC und  $2 \times 10^6$  allogene BALB/c T-Zellen unter Transwells kokultiviert (grüne Linie). Gleichzeitig wurden GM-CSF differenzierte bzw. LPS gereifte C57BL/6 Mikroglia entweder direkt mit einem leeren Transwell darüber (links) oder im Transwell (rechts) zugesetzt. Die Messung der T-Zellproliferation erfolgte über den Einbau von radioaktiv markiertem  $^3\text{H}$ -TdR.

Als Kontrolle des Transwelleffekts wurde der inhibitorische Assay, bei dem auch die Mikroglia im Kontakt mit den T-Zellen und den APC standen, in Anwesenheit von leeren Transwells durchgeführt (Abb. 12, linke Seite). Wie bereits beschrieben wurde in Anwesenheit der C57BL/6 Mikroglia die T-Zellproliferation deutlich unterdrückt, während die Proliferation in Abwesenheit der Mikroglia ungehindert ablaufen konnte (grüne Linie). Dabei wurde eine vergleichbare inhibitorische Eigenschaft mit GM-CSF differenzierten Mikroglia und auch mit LPS stimulierten Mikroglia beobachtet. Die T-Zellproliferation wurde in Anwesenheit der Mikroglia auf 10 % reduziert. Wurden die Mikroglia im Transwell kokultiviert (rechte Seite), wurde die Proliferation nicht reduziert. Trotz Anwesenheit der Mikroglia konnten die T-Zellen bei räumlicher Trennung der Mikroglia ungehindert proliferieren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Inhibition Zellkontakt-abhängig stattfindet. Erneut war das Ergebnis unabhängig vom Stimulationstatus der Mikroglia.

Als putative inhibitorische Moleküle sind eine ganze Reihe von Rezeptoren und Molekülen denkbar. Deshalb wurden in nachfolgenden Experimenten die Transkriptmengen verschiedener putativer Interaktionsmoleküle bei BALB/c und C57BL/6 Mikroglia mittels Real-Time PCR-Analyse verglichen. Obwohl das Transwellexperiment deutliche Hinweise darauf gegeben hat, dass die Inhibition kontaktabhängig vermittelt wird, sollten zunächst die in der Literatur beschriebenen inhibitorischen Moleküle ausgeschlossen werden. Deshalb wurde die Expression von iNOS (induzierbare NO-Synthase) undIDO und den inhibitorischen Zytokinen, IL-10 und TGF $\beta$  in verschiedenen stimulierten Mikroglia aus BALB/c und C57BL/6 analysiert. Die Expression der Zielgene wurde in der Analyse auf die Expression von  $\beta$ Aktin normalisiert und relativiert auf die Expression des Zielgens in unstimulierten BALB/c Mikroglia. Wie in Abb. 13 zu sehen, ist die iNOS-Expression in unstimulierten C57BL/6 Mikroglia höher als bei BALB/c Mikroglia. Dennoch steigt die Expression in stimulierten Mikroglia beider Mausstämme auf eine vergleichbare Menge an. iNOS ist also sowohl durch LPS und IFN $\gamma$  als auch durch die gleichzeitige Stimulation in Mikroglia gleichartig induziert. Im Gegensatz dazu ist die Stimulation mit LPS nicht ausreichend, um die Expression von IDO zu induzieren. Allerdings wird in Mikroglia beider Mausstämme IDO gleichermaßen von IFN $\gamma$  induziert. Noch stärker wird die Transkriptmenge nach der simultanen Stimulation mit IFN $\gamma$  und LPS erhöht. Bei der Analyse der IDO Expression ist somit ebenfalls kein Unterschied der Transkriptmenge in Mikroglia aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen zu sehen.



**Abb. 13: Die relative Expression beschriebener inhibitorischer Faktoren ist in C57BL/6 Mikroglia nicht erhöht**

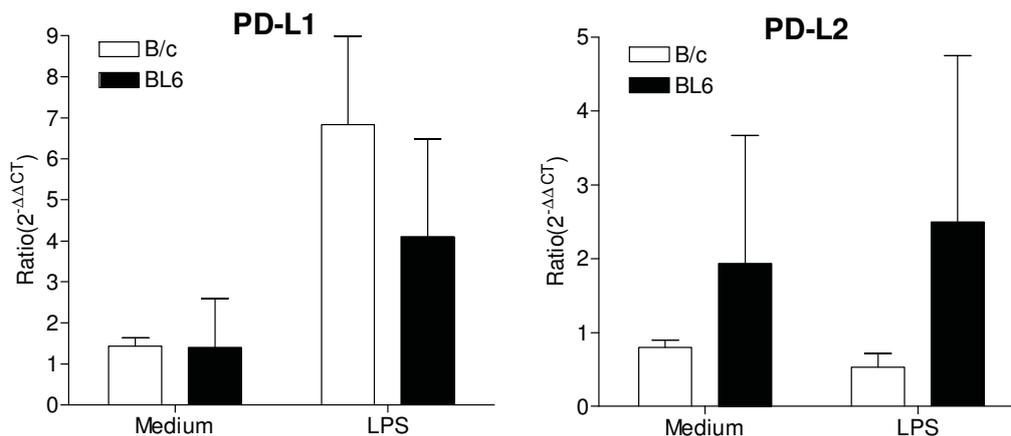
Vergleich der Expression von iNOS, IDO, IL10 und TGFβ in GM-CSF differenzierter Mikroglia nach verschiedenen Stimulationen aus BL6 und B/c Mäusen. Gezeigt ist die relative Expression normiert auf unstimulierte BALB/c Mikroglia und relativiert zu βAktin.

Innerhalb der Transkriptmengen des inhibitorischen Zytokins IL-10 zeigen sich geringe Unterschiede. In unstimulierten und IFN<sub>γ</sub> stimulierten Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen ist die Transkriptmenge 5-fach bzw. 20-fach erhöht gegenüber BALB/c Mikroglia. Allerdings lies sich dies nicht für die anderen beiden Stimulationsbedingungen nachweisen. Nach alleiniger Stimulation mit LPS und gleichzeitiger Stimulation mit LPS und IFN<sub>γ</sub> war die Transkriptmenge zwar ebenfalls in Mikroglia aus beiden Mausstämmen gegenüber unstimulierter erhöht, hier in BALB/c Mikroglia jedoch wesentlich höher als in C57BL/6 Mikroglia.

Die Transkriptmenge des inhibitorischen Zytokins TGFβ war unabhängig von der Stimulation nahezu gleichbleibend und schwankte um ein Verhältnis von eins bei beiden Mausstämmen und war daher nicht induzierbar. Die Basisexpression von TGFβ zeigte also ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede.

Da naheliegende lösliche Faktoren als Mediatoren der Hemmung ausgeschlossen werden konnten, wurden ebenfalls Oberflächenmoleküle untersucht. Eine wichtige Gruppe stellen die sogenannten

„programmed death“ (PD) –Rezeptoren dar. Deren Liganden sind auf der Oberfläche von APC nachweisbar. Also wurde auch die Transkriptmenge der beiden Liganden PD-L1 und PD-L2 untersucht. Da die Hemmung unabhängig von der Stimulation der C57BL/6 Mikroglia immer zu finden ist, wurden nachfolgend nur noch GM-CSF differenzierte und damit unstimulierte oder LPS stimulierte Mikroglia untersucht.

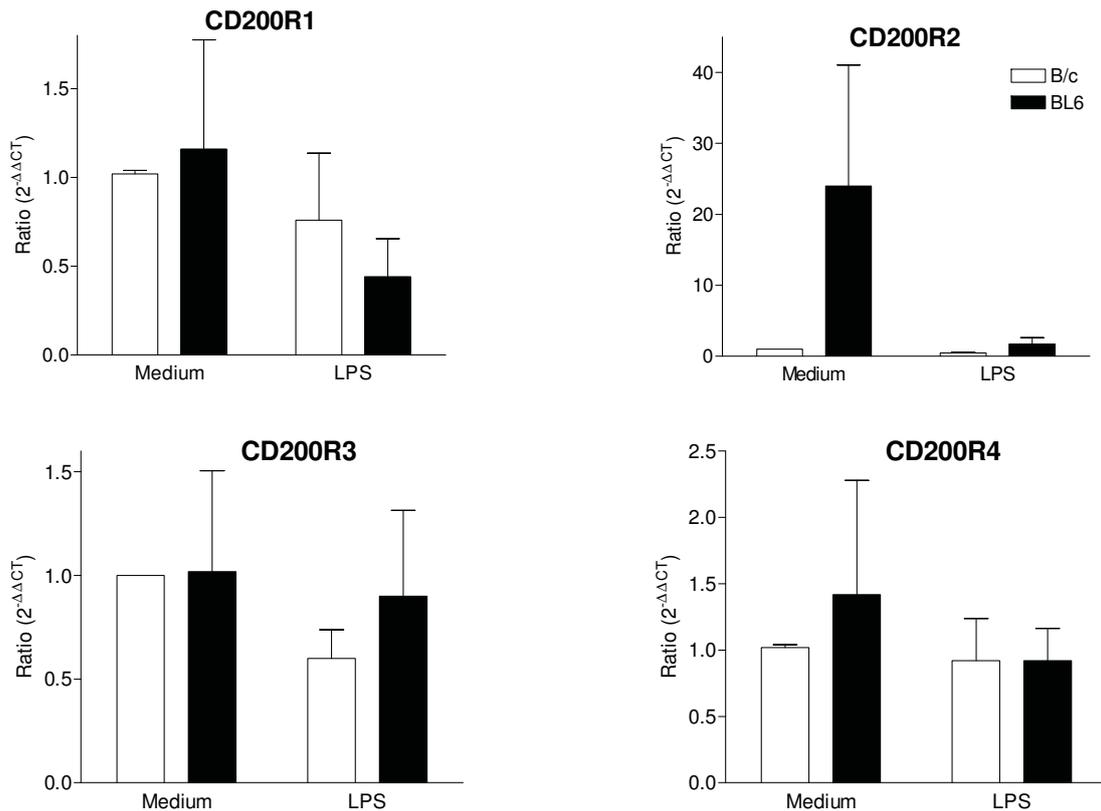


**Abb. 14: Vergleichbare relative Expression der inhibitorischen Liganden PD-L1 und PD-L2**

Vergleich der Expression von PD-L1 und PD-L2 in GM-CSF differenzierten Mikroglia mit und ohne LPS Stimulation aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen. Gemessen ist die relative Expression normiert auf unstimulierte BALB/c Mikroglia und relativiert zu  $\beta$ Aktin.

Wie in Abb. 14 zu sehen, ist die Expression dieser Liganden nur unwesentlich durch LPS induzierbar, wobei PD-L1 in LPS stimulierter Mikroglia 5-fach erhöht zu finden war, PD-L2 hingegen nur gering induziert wurde (2-fach). Sowohl PD-L1 als auch PD-L2 sind aber auf Mikroglia beider Mausstämmen im gleichen Maße zu finden.

Im ZNS ist ebenfalls eine weitere Familie inhibitorischer Moleküle beschrieben. Der Ligand CD200 ist auf sehr vielen unterschiedlichen Zellen zu finden, die vier bekannten CD200 Rezeptoren hingegen werden APC-spezifisch exprimiert. Die Transkriptmengen aller vier Rezeptoren in unstimulierten und LPS stimulierten Mikroglia aus BALB/c und C57BL/6 Mikroglia wurden gemessen (Abb. 15).



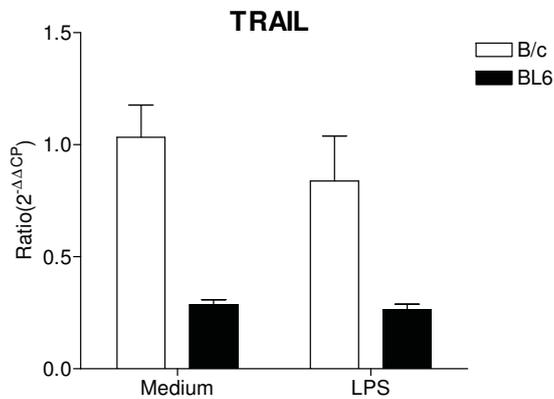
**Abb. 15: Vergleichbare relative Expression der inhibitorischen Rezeptoren für CD200**

Vergleich der Expression von CD200R1, CD200R2, CD200R3 und CD200R4 von GM-CSF differenzierten Mikroglia mit und ohne LPS Stimulation aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen. Gemessen ist die relative Expression normiert auf unstimulierte BALB/c Mikroglia und relativiert zu  $\beta$ Aktin.

Die Rezeptoren CD200R1, CD200R3 und CD200R4 wurden durch LPS nicht beeinflusst, in Mikroglia aus beiden Mausstämmen waren die Expressionslevel unabhängig von der Stimulation vergleichbar und zeigten deshalb ein Verhältnis von eins. Die Transkriptmenge von CD200R2 war in unstimulierter C57BL/6 Mikroglia wesentlich höher als in BALB/c Mikroglia. Jedoch lies sich diese erhöhte Transkriptionsmenge nicht in LPS stimulierter Mikroglia bestätigen. Da sowohl unstimulierte als auch LPS stimulierte Mikroglia die Hemmung der T-Zellproliferation zeigten, ist die CD200R Familie als Mediator der Hemmung unwahrscheinlich.

Des Weiteren wurde ebenfalls die Transkriptmenge von Fas-Ligand untersucht. Die Expression von Fas-Ligand gilt im Gehirn als wichtiger Kontrollmechanismus und hilft bei der apoptotischen Beseitigung von aktivierten T-Zellen, die Fas auf ihrer Oberfläche tragen. Allerdings konnte unabhängig von der Stimulation weder bei BALB/c noch bei C57BL/6 Mikroglia eine Expression von Fas-Ligand nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

TRAIL gehört wie FasLigand ebenfalls in die Gruppe der Apoptose induzierenden Liganden der TNF-Rezeptor Superfamilie, deshalb wurde ebenfalls die Transkriptmenge von TRAIL bei den Mikroglia beider Mausstämme verglichen (Abb. 16)



**Abb. 16: C57BL/6 Mikroglia exprimieren geringfügig weniger TRAIL als BALB/c Mikroglia**

Vergleich der Expression von TRAIL von GM-CSF differenzierten Mikroglia mit und ohne LPS Stimulation aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen. Gemessen ist die relative Expression normiert auf unstimulierte BALB/c Mikroglia und relativiert zu  $\beta$ Aktin.

Die Transkriptmenge von TRAIL war in GM-CSF differenzierter und LPS stimulierter BALB/c Mikroglia vergleichbar und schwankte damit um ein Verhältnis von eins. Auch in C57BL/6 Mikroglia waren keine Unterschiede zwischen GM-CSF differenzierter und LPS stimulierter Mikroglia zu sehen, allerdings ist die generelle Transkriptmenge von TRAIL in C57BL/6 Mikroglia geringer. C57BL/6 Mikroglia exprimierten im Vergleich zu Mikroglia aus BALB/c Mäusen nur ein Viertel der Transkriptmenge von TRAIL. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die höhere Transkriptmenge von TRAIL in BALB/c Mikroglia diesen Apoptosemechanismus als Grund für die Hemmung der C57BL/6 Mikroglia ausschließt.

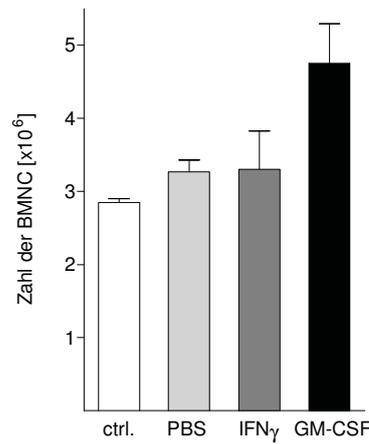
Weitere Untersuchungen müssen zeigen, wie sich die inhibitorische Aktivität der C57BL/6 Mikroglia erklären lässt.

## 2 Effekt von GM-CSF auf ZNS-DC *in vivo*

GM-CSF wirkt als hämatopoetischer Wachstumsfaktor und inflammatorisches Zytokin und ist im Gehirn während vieler chronischer Entzündungsreaktionen zu finden (Franzen et al., 2004). Dennoch ist in diesem spezialisierten Immunkompartiment wenig bekannt über GM-CSF in der Abwesenheit inflammatorischer Stimuli wie TLR Liganden oder zusätzlicher Zytokine, die z. B. während Infektionen oder autoimmunen Erkrankung auftreten. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Funktion des proinflammatorischen Zytokins *in vivo* unter „steady-state“ Bedingungen untersucht. Damit sollte die Frage geklärt werden, inwieweit GM-CSF die Anwesenheit von DC im Gehirn ohne zusätzliche inflammatorischen Bedingungen induzieren kann. Zu diesem Zweck wurden C57BL/6 Mäuse intrazerebroventrikulär (i.c.v.) mit rekombinantem GM-CSF mittels osmotischer Minipumpen behandelt. Diese Pumpen erlauben die kontinuierliche Applikation von GM-CSF (1 µg/Tag) über bis zu sieben Tage direkt in den Seitenventrikel des Gehirns. Als Kontrollmäuse wurden zum einen unbehandelte Mäuse gewählt, die den Ursprungszustand beschreiben sollten. Eine weitere Kontrollgruppe waren PBS behandelte Tiere. Diese Tiere erhielten die gleiche Pumpe wie die GM-CSF behandelten, allerdings wurde hier die Pumpe nur mit der Trägersubstanz gefüllt. Damit sollten Veränderungen durch Operation und Implantation nachvollzogen werden. Eine weitere Kontrollgruppe beinhaltete Mäuse, deren Pumpen mit IFN $\gamma$  (1000U/Tag) gefüllt waren. IFN $\gamma$  ist wie GM-CSF ein wichtiges inflammatorisches Zytokin und wurde eingesetzt, um einen generellen Einfluss inflammatorische Zytokine auf das Immunsystem des ZNS einschätzen zu können. Die Tiere wurden für 4-6 Tage behandelt und danach analysiert. Da an den Tagen vier und fünf die Varianz innerhalb GM-CSF behandelter Mäuse sehr hoch war, mit voranschreitender Behandlung aber kleiner wurde (Daten nicht gezeigt), sind für die folgenden Analysen Tiere an Tag sechs untersucht worden.

Zunächst wurde die Zahl der mononukleären Zellen im Gehirn („brain mononuclear cells“, BMNC) ermittelt, die einen ersten Indikator für die Stärke der inflammatorischen Antwort im ZNS darstellt (Abb. 17).

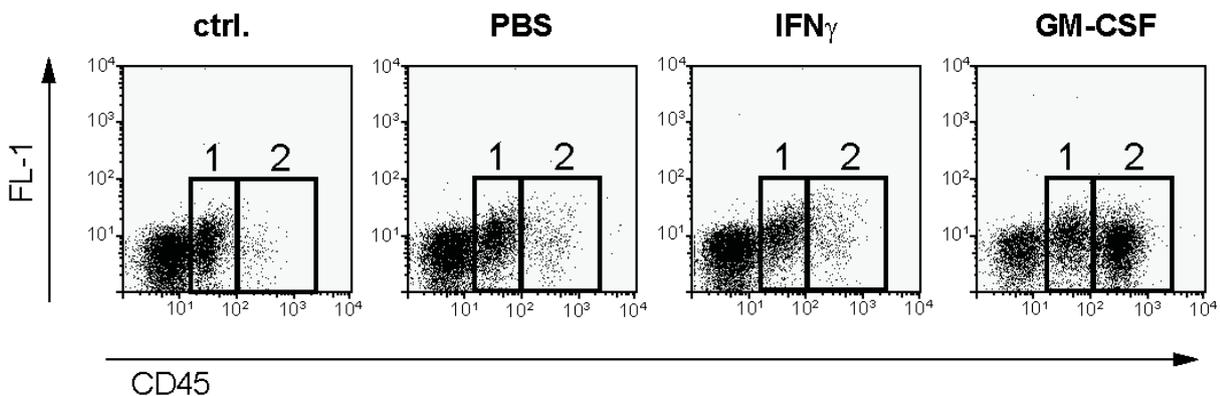
Aus unbehandelten Mäusen konnten annähernd  $3 \times 10^6$  Zellen isoliert werden. Eine nur geringe Erhöhung wurde bei Mäusen der anderen beiden Kontrollgruppen erreicht ( $3,3 \times 10^6$  Zellen). Dagegen konnten aus Mäusen nach GM-CSF Infusion durchschnittlich  $4,8 \times 10^6$  Zellen isoliert werden. Die i.c.v. GM-CSF Behandlung resultierte also in einer deutlichen Erhöhung der BMNC im ZNS.



**Abb. 17: I.c.v. GM-CSF Gabe erhöht die Zahl mononukleärer Zellen im ZNS**

Vergleich der BMNC-Zahlen unbehandelter Kontrollmäuse (ctrl.) und Mäusen, die über eine Pumpe PBS, IFN $\gamma$  oder GM-CSF in den Ventrikel über eine Dauer von sechs Tagen erhielten. Die Zahlen zeigen Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit 2-3 Tieren pro Gruppe.

BMNC beinhalten sowohl CD45<sup>-</sup> Zellen, die vor allem Endothelzellen und Astrozyten beinhalten wie auch CD45<sup>+</sup> hämatopoietische Zellen, die sogenannten intrazerebralen Leukozyten (ICL). Aufgrund der Stärke der CD45 Expression können Hirn-infiltrierende von Hirn-residenten Zellen unterschieden werden (Sedgwick et al., 1991). Während infiltrierende Zellen eine hohe CD45 Expression aufweisen, zeigen Hirn-residente Mikroglia eine geringe CD45 Expression. Die Zahl der CD45<sup>-</sup> Zellen betrug ungefähr  $2 \times 10^6$  unabhängig von der Behandlung. In unbehandelten Mäusen betrug die CD45<sup>+</sup> Population 91% CD45<sup>low</sup> Mikroglia und 9% infiltrierende CD45<sup>high</sup> Zellen (Abb.18 und Tabelle 2). In PBS behandelten Mäusen war das Verhältnis vergleichbar, während in IFN $\gamma$  behandelten Mäusen der prozentuale Anteil der infiltrierenden Zellen 12% ausmachte. Besonders groß war die Zunahme der CD45<sup>high</sup> Zellen allerdings in GM-CSF behandelten Mäusen. Hier betrug der Anteil der infiltrierenden Zellen 56,2%.



**Abb. 18: I.c.v. GM-CSF Gabe steigert den Anteil der ICL mit einer hohen CD45 Expression**

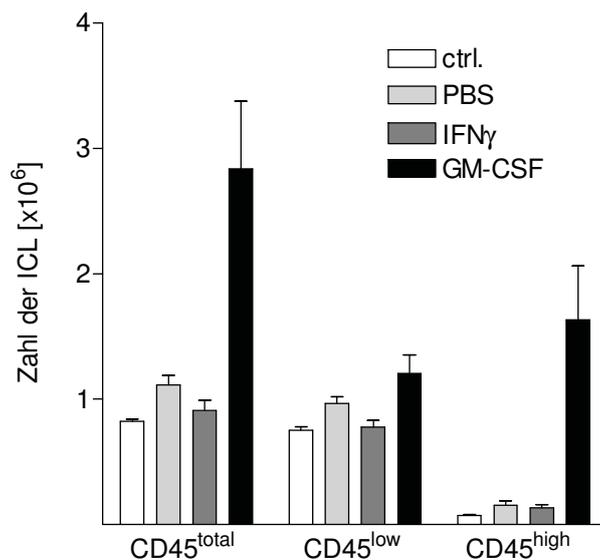
*Ex vivo* Analyse der CD45 Expression aus unbehandelten Kontrollmäusen (ctrl.), nach i.c.v. Gabe von PBS, IFN $\gamma$  oder GM-CSF. ICL wurden mit einem  $\alpha$ CD45-Ak gefärbt und durch PI-Färbung tote Zellen ausgeschlossen. Region 1: CD45<sup>low</sup> Zellen, Region 2: CD45<sup>high</sup> Zellen.

	CD45 <sup>low</sup>	CD45 <sup>high</sup>
ctrl.	91,3 %	8,7 %
PBS	89,1 %	10,9 %
IFN $\gamma$	87,9 %	12,1 %
GM-CSF	43,8 %	56,2 %

**Tabelle 2 : Prozentuale Anteile der CD45<sup>low</sup> und CD45<sup>high</sup> Zellen nach i.c.v. Behandlung**

*Ex vivo* Analyse der CD45 Expression aus unbehandelten Kontrollmäusen (ctrl.), nach i.c.v. Gabe von PBS, IFN $\gamma$  oder GM-CSF. Innerhalb der lebenden, CD45<sup>+</sup> Zellen zeigen die Zahlen die Verhältnisse von CD45<sup>low</sup> (Region 1) und CD45<sup>high</sup> (Region 2) Zellen.

Diese CD45<sup>high</sup> Zellen waren verantwortlich für den generellen Anstieg der BMNC in GM-CSF behandelten Mäusen. Trägt man die Zellzahl der ICL - also aller CD45<sup>+</sup> Zellen - auf und vergleicht diese mit der CD45<sup>low</sup> und CD45<sup>high</sup> Zunahme kann man die Veränderung der Mikroglia population und der infiltrierenden Zellen nachvollziehen.



**Abb. 19: I.c.v. GM-CSF Gabe steigert die Zahl der ICL mit einer hohen CD45 Expression**

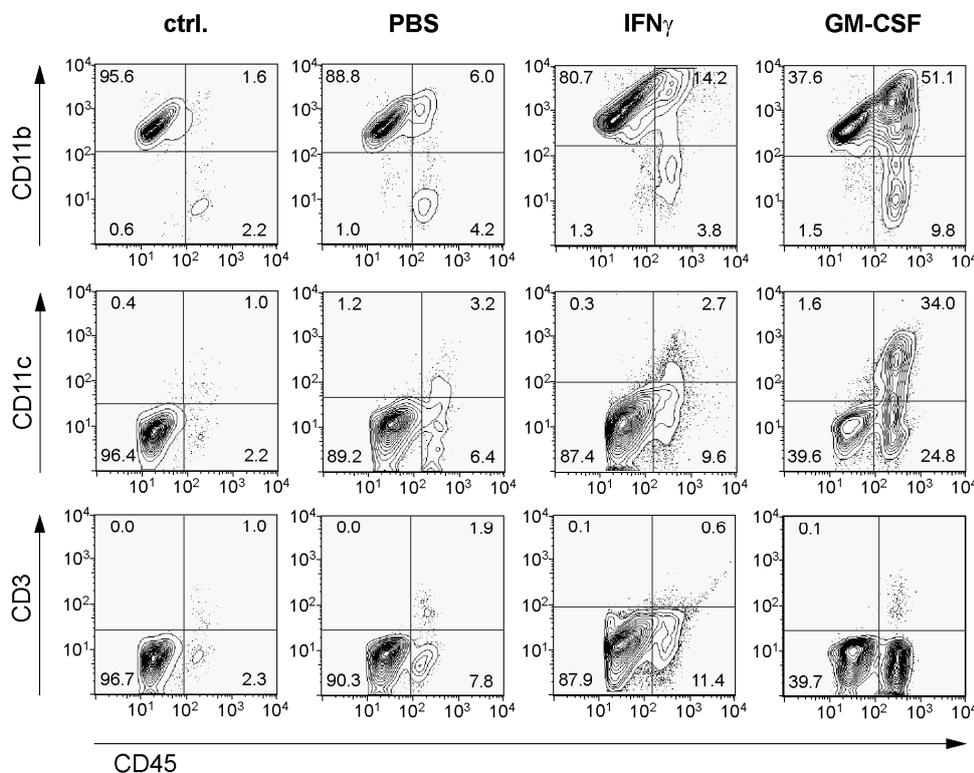
Vergleich der ICL-Zahlen unbehandelter Kontrollmäuse (ctrl.) und nach i.c.v. Behandlung mit PBS, IFN $\gamma$  oder GM-CSF. Angegeben ist die Zahl aller lebenden Leukozyten (CD45<sup>total</sup>) sowie die Verteilung der CD45<sup>low</sup> und CD45<sup>high</sup> Zellen.

In Abb. 19 ist zu sehen, dass die Gesamtzahl der ICL in den drei Kontrollgruppen ungefähr  $1 \times 10^6$  Zellen betrug, während aus GM-CSF behandelten Tieren  $2,9 \times 10^6$  ICL isoliert werden konnten. Dabei war der Anstieg innerhalb der CD45<sup>low</sup> Mikroglia in allen Gruppen sehr gering und lag bei ca.  $1 \times 10^6$ . Aus GM-CSF behandelten Mäusen wurden  $1,2 \times 10^6$  CD45<sup>low</sup> Zellen isoliert, während der Großteil der ICL Zunahme durch einen deutlichen Anstieg der CD45<sup>high</sup> infiltrierenden Zellen

verursacht wurde. Den weniger als  $0,2 \times 10^6$  CD45<sup>high</sup> Zellen in den 3 Kontrollgruppen standen  $1,7 \times 10^6$  CD45<sup>high</sup> in den GM-CSF behandelten Tieren gegenüber. Die i.c.v. Gabe von GM-CSF bedingte also einen deutlichen Anstieg infiltrierender Zellen in Gehirn, während die Zellzahl der Mikroglia von GM-CSF nicht signifikant beeinflusst wurde.

## 2.1 Charakterisierung der Zellpopulationen

GM-CSF ist bekannt als Differenzierungsfaktor für Zellen der myeloiden Linie, insbesondere myeloider DC. Deshalb sollte im Folgenden die zelluläre Zusammensetzung der infiltrierenden Zellen näher charakterisiert werden. Dafür wurden die BMNC isoliert und die Subpopulationen der Leukozyten mittels durchflusszytometrischer Analyse definiert. In Abb. 20 sind CD45<sup>+</sup> ICL dargestellt, die hinsichtlich verschiedener Zellpopulationen untersucht wurden. Die Quadranten sind so gelegt, dass die Prozentzahlen in den Quadranten die Prozente für CD45<sup>low</sup> und CD45<sup>high</sup> angeben, die positiv für die einzelnen Subpopulationen sind. CD11b färbt spezifisch myeloide Zellen an, CD11c ist spezifisch für DC und CD3 ist spezifisch auf T-Zellen exprimiert.



**Abb. 20: GM-CSF im Gehirn erhöht den Anteil myeloider ICL**

Phänotypische Charakterisierung der Subpopulationen nach i.c.v. Behandlung. ICL wurden nach der Behandlung mit  $\alpha$ CD45-Ak gefärbt und die angegebenen Subpopulationen im Durchflusszytometer analysiert. Gegatet auf lebende CD45<sup>+</sup> Zellen zeigen die Quadranten in den Konturplots die Prozentzahlen der CD45<sup>low</sup> und CD45<sup>high</sup> Zellen für die angegebenen Subpopulationen.

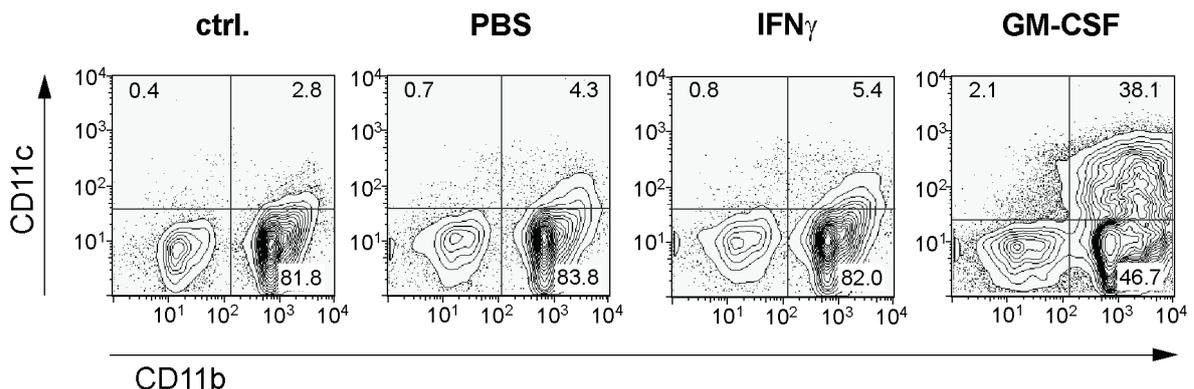
Mikroglia zeichnen sich durch die Expression von CD11b aus. Alle CD45<sup>low</sup> Zellen waren CD11b<sup>+</sup>. In unbehandelten Kontrollmäusen wurden nur 1,6% CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>high</sup> Zellen detektiert. Dieser Anteil stieg nur wenig in Mäusen, die mit PBS oder IFN $\gamma$  (6% und 14,2%) behandelt waren, während der Anteil bei über 50% in GM-CSF behandelten Mäusen lag. Nur 10% der Leukozyten in diesen Mäusen waren CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup>.

Den DC-Marker CD11c trugen weniger als 1% der CD45<sup>high</sup> Leukozyten in unstimulierten Mäusen, und nur ein geringer Anstieg war in PBS und IFN $\gamma$  stimulierten Mäusen zu verzeichnen. In Anwesenheit von GM-CSF stieg der Anteil dagegen auf 34%.

Die GM-CSF Behandlung zeigte nur einen geringen Einfluß auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen; hier zeigte sich kein signifikanter Anstieg in Unabhängigkeit der Behandlung, und das gleiche Ergebnis zeigte sich bei B220<sup>+</sup> B-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Nach diesen Untersuchungen zeigte GM-CSF seinen größten Effekt auf infiltrierende CD45<sup>high</sup> Zellen, während der Einfluß auf ZNS residente Mikroglia nur sehr gering ausfiel. Der Anteil der CD45<sup>low</sup>/CD11c<sup>+</sup> Zellen änderte sich kaum durch verschiedene Behandlungen.

Der deutlichste Effekt der i.c.v. GM-CSF Gabe wurde also auf myeloiden Zellen und DC beobachtet. Im Folgenden soll nun die Subpopulation der DC bezüglich ihres myeloiden vs. nicht-myeloiden Phänotyps untersucht werden. Dazu wurden die Expression von CD11b und CD11c in den unterschiedlich behandelten Mäusen analysiert (Abb. 21).



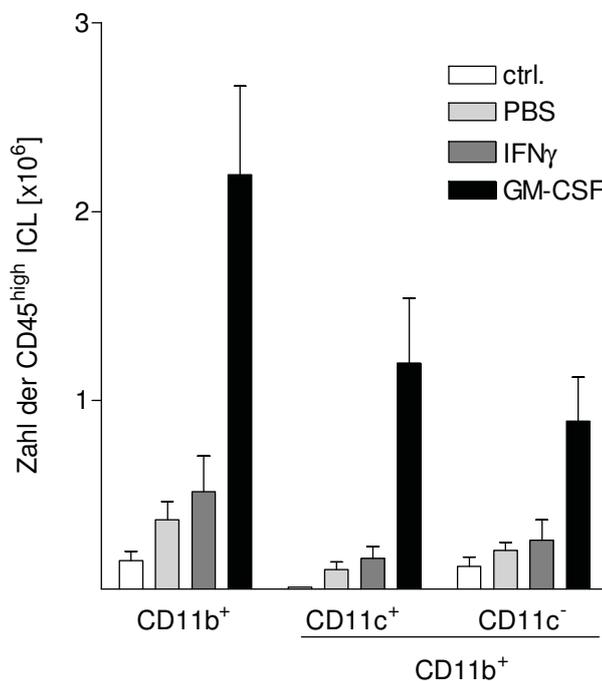
**Abb. 21: I.c.v. GM-CSF Gabe erhöht den Anteil myeloider DC**

Analyse der DC nach i.c.v. Behandlung. ICL wurden nach der Behandlung mit den angegebenen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Gated auf lebende CD45<sup>+</sup> zeigen die Quadranten in den Konturplots die Verhältnisse der CD11b oder/und CD11c exprimierenden ICL.

Innerhalb der drei Kontrollgruppen war der Anteil der CD11c<sup>+</sup> Zellen sehr gering. In unbehandelten Tieren lag der Anteil bei unter 3% und auch in den anderen beiden

Kontrollgruppen stieg diese Prozentzahl kaum (4.3% und 5.4%). Der Anteil dieser CD11c<sup>+</sup> Zellen, der nicht CD11b<sup>+</sup> war, lag immer unter 1%. In GM-CSF behandelten Tieren jedoch stieg der Anteil der CD11c<sup>+</sup> Zellen auf 38%. Nahezu alle Zellen, die nach i.c.v. GM-CSF Infusion CD11c<sup>+</sup> waren, exprimierten zeitgleich CD11b. Also lag der vorwiegende Einfluß der GM-CSF Behandlung innerhalb der CD45<sup>high</sup>/CD11b<sup>+</sup> myeloiden DC Population.

Noch deutlicher wird das Ergebnis der GM-CSF Gabe, wenn man die absoluten Zellzahlen betrachtet (Abb. 22).



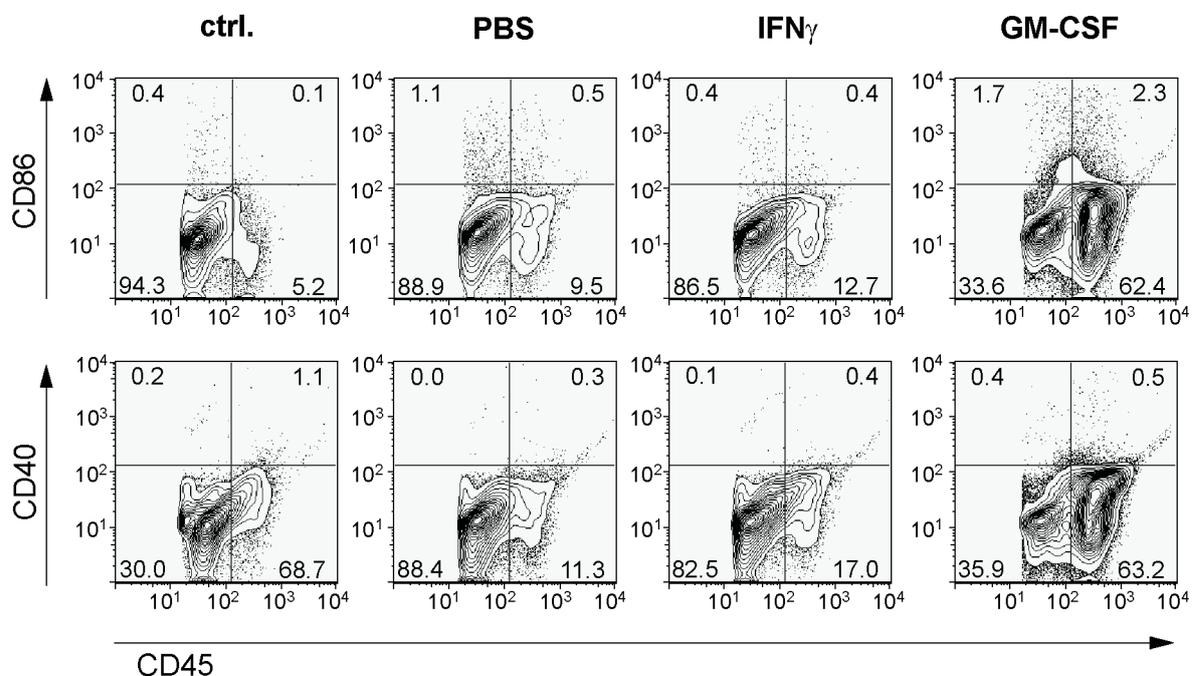
**Abb. 22: I.c.v. GM-CSF Gabe induzierte die Zunahme der Gesamtzahl myeloider DC**

Zahl der ICL positiv für CD11b und CD11c innerhalb der CD45<sup>high</sup> Zellen nach i.c.v. Behandlung. ICL wurden nach der Behandlung mit den angegebenen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Auf der linken Seite sind CD11b<sup>gesamt</sup> ICL aufgetragen, auf der rechten Seite sind diese aufgeteilt in CD11c<sup>+</sup> und CD11c<sup>-</sup>.

In den drei Kontrollgruppen betrug die Zahl der myeloiden ICL weniger als 0,5x10<sup>6</sup>. In GM-CSF behandelten Mäusen hingegen stieg die Zahl auf 2,1x10<sup>6</sup> an. Interessanterweise beinhaltete diese myeloide CD45<sup>high</sup> ICL Population mehr CD11c<sup>+</sup> (1,2x10<sup>6</sup>) als CD11c<sup>-</sup> Zellen (0,9x10<sup>6</sup>), während das Verhältnis CD11c<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup> in den drei Kontrollgruppen genau entgegengesetzt war. Hier waren 40% negativ für CD11c und 60% positiv. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der größere Einfluss der i.c.v. GM-CSF Gabe innerhalb der myeloiden DC Population lag.

Die Fähigkeit myeloider Zellen als APC zu dienen, hängt unter anderem von der Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80, CD86 und der Expression von MHCII ab. Deshalb wurde die Expression dieser typischen Oberflächenmoleküle auf CD45<sup>+</sup> ICL untersucht (Abb. 23 und 24).

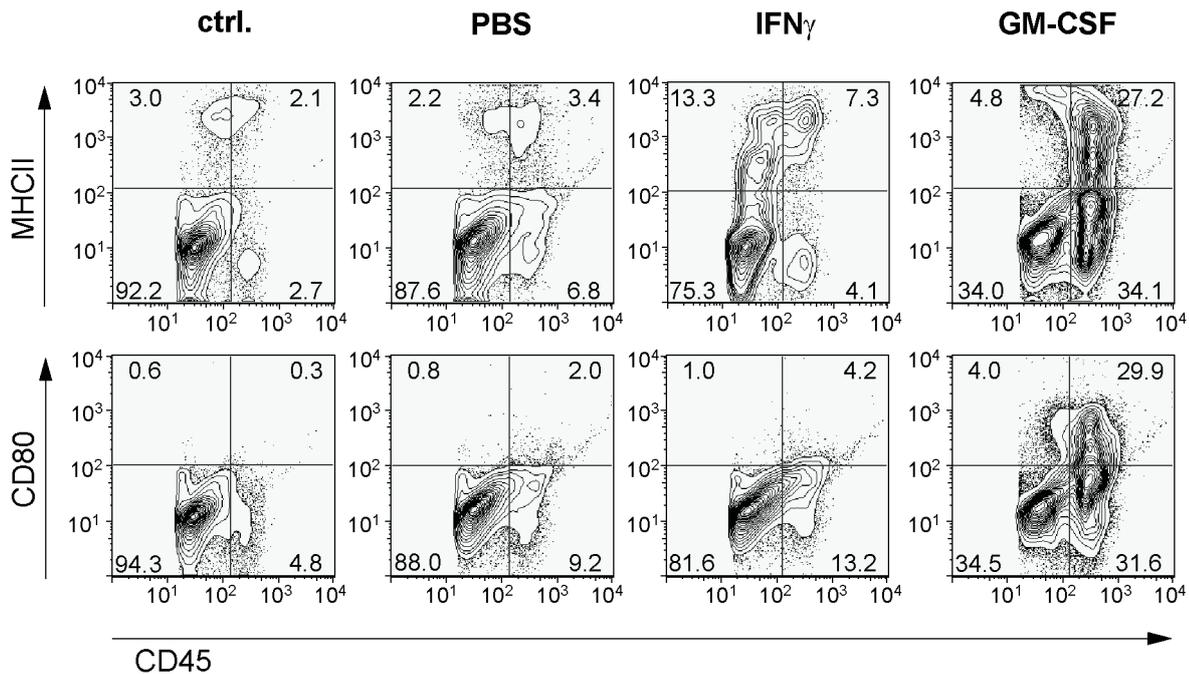
Innerhalb der CD45<sup>high</sup> Population war die Expression von CD86 nur geringfügig durch die Behandlung mit GM-CSF beeinflusst. In den drei Kontrollgruppen lag der Prozentsatz der CD86<sup>+</sup> Zellen unter 2%, wenn man alle CD45<sup>+</sup> Zellen analysiert. Auch nach i.c.v. GM-CSF Behandlung stieg der Anteil nur auf 4%, wobei die größere Veränderung wieder in der CD45<sup>high</sup> Population zu beobachten war. Die Expression von CD40 veränderte sich unabhängig von der Behandlung nicht signifikant und lag immer unter 1,5%.



**Abb. 23: Intrazerebrale GM-CSF Behandlung hat kaum Einfluss auf die kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86**

Phänotypische Charakterisierung der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 nach i.c.v. Behandlung. ICL wurden nach der Behandlung mit den angegebenen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Gated auf die CD45<sup>+</sup> ICL geben die Quadranten die Prozente der CD45<sup>low</sup> und CD45<sup>high</sup> Zellen für die angegebenen kostimulatorischen Moleküle an.

Eine deutliche Veränderung konnte hingegen bei der Expression von MHCII und CD80 beobachtet werden (Abb.24).



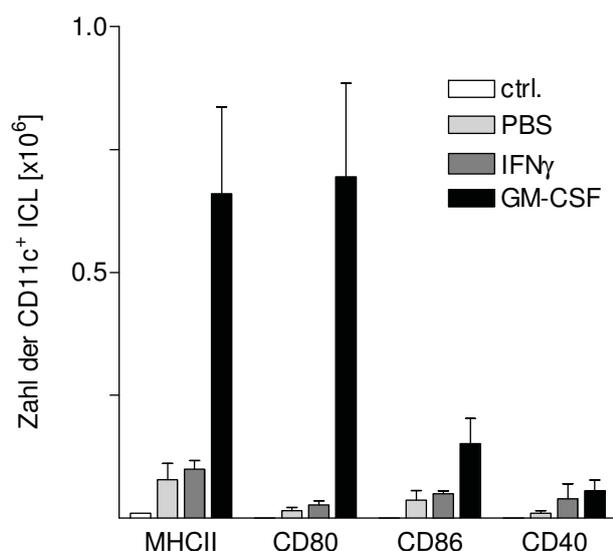
**Abb. 24: Erhöhte Expression von MHCII und CD80 auf ICL aus GM-CSF behandelten Mäusen**

Phänotypische Charakterisierung der Expression von MHCII und CD80 nach i.c.v. Behandlung. ICL wurden nach der Behandlung mit den angegebenen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Gegated auf die CD45<sup>+</sup> ICL geben die Quadranten die Prozente der CD45<sup>low</sup> und CD45<sup>high</sup> Zellen für die angegebenen kostimulatorischen Moleküle an.

Hier war innerhalb der CD45<sup>high</sup> Population die MHCII Expression nur unwesentlich durch PBS (3,4%) und IFN $\gamma$  (5,3%) induziert im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (2,1%). Allerdings wurde MHCII sehr deutlich induziert durch GM-CSF (27,2%). Die Expression von CD80 zeigte einen vergleichbaren Anstieg nach GM-CSF Infusion (29,9%), und auch hier ließ sich wieder nur ein geringer Anstieg nach i.c.v. PBS und IFN $\gamma$  Gabe (<5%) nachweisen.

Obwohl die wesentlichen Unterschiede innerhalb der CD45<sup>high</sup> Population festgestellt wurden, konnten geringe Veränderungen in der CD45<sup>low</sup> Mikroglia Population detektiert werden. Die Behandlung mit GM-CSF induzierte eine kleine Population mit einer sehr starken MHCII Expression innerhalb der CD45<sup>low</sup> ICL. Dies weist darauf hin, dass GM-CSF auch einen geringen Einfluß auf lokale Mikroglia hatte. Eine deutliche Veränderung konnte innerhalb der CD45<sup>low</sup> Population auch durch die intrazerebrale Gabe von IFN $\gamma$  induziert werden. 13,3% der CD45<sup>low</sup> ICL steigerten ihre MHCII Expression.

Auch hier ist der Effekt noch klarer darstellbar, wenn man die absoluten Zellzahlen betrachtet (Abb. 25).



**Abb. 25: Erhöhte Anzahl aktivierter CD11c<sup>+</sup> ICL in GM-CSF behandelten Mäusen**

Zellzahl der ICL positiv für die angegebene kostimulatorische Moleküle und MHCII innerhalb der CD11c<sup>+</sup> Zellen nach i.c.v. Behandlung. ICL wurden nach der Behandlung mit den angegebenen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

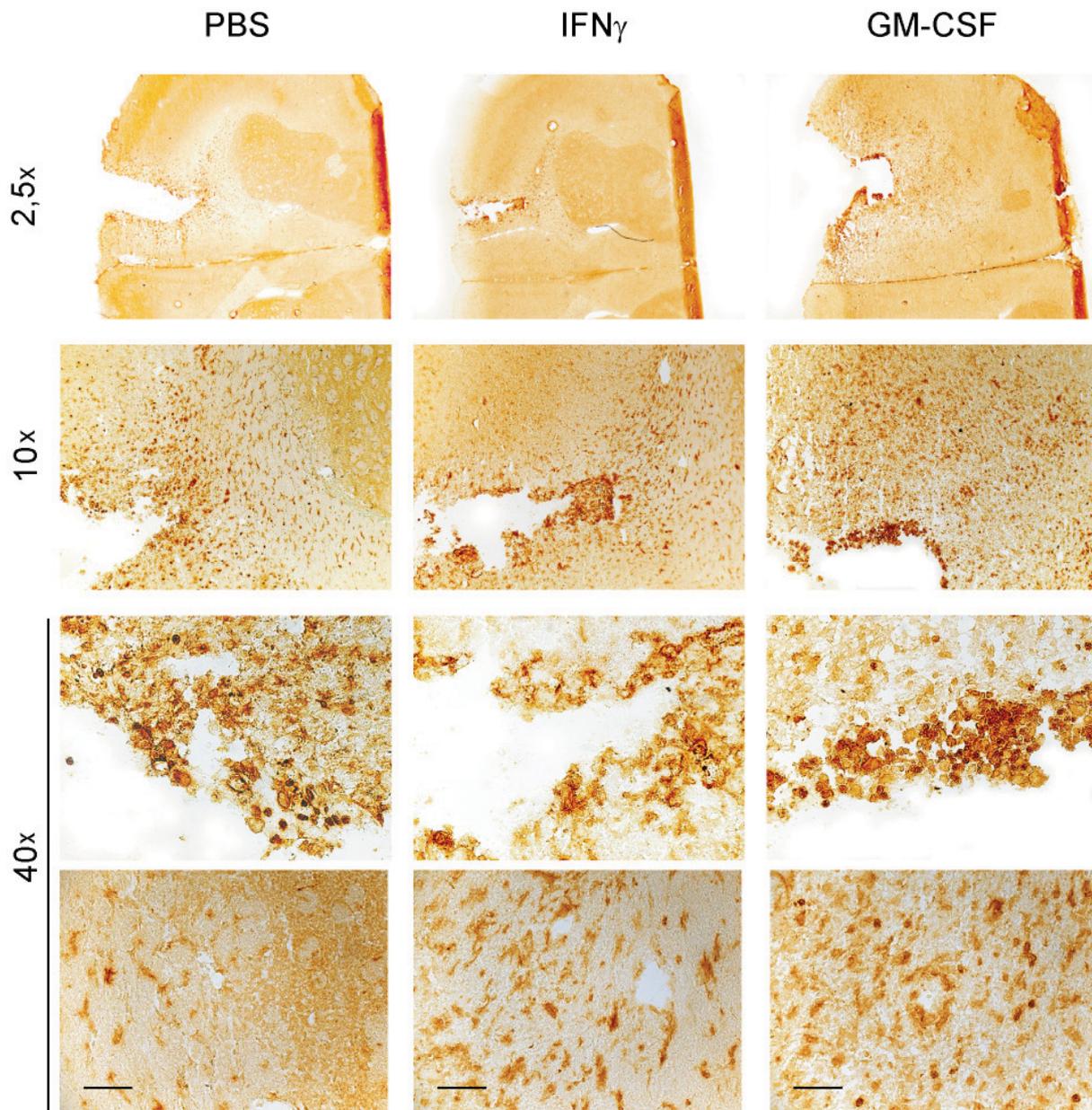
Wie auch schon bei der vorangegangenen durchflusszytometrischen Analyse, waren die Veränderungen in absoluten Zellzahlen in den drei Kontrollgruppen nur sehr gering. Dies war anders nach i.c.v. GM-CSF Gabe. Von den  $2,8 \times 10^6$  CD45<sup>high</sup> ICL aus Abb. 18, die durch die GM-CSF Behandlung in ZNS induziert wurden, waren  $0,7 \times 10^6$  MHCII<sup>+</sup> und CD80<sup>+</sup>, während weniger als 0,05% in den Kontrollmäusen positiv waren. CD86<sup>+</sup> ICL waren zwar nahezu nicht detektierbar, ihre Zahl war jedoch 5-fach höher in den GM-CSF behandelten Mäusen. Die myeloiden DC, die durch die i.c.v. Behandlung mit GM-CSF im Gehirn auftreten, haben einen reifen Phänotyp- besonders MHCII und CD80 sind deutlich hochreguliert.

## 2.2 Immunhistologische Untersuchung

Aus PBS, IFN $\gamma$  und GM-CSF behandelten C57BL/6 Mäusen wurden die Gehirne entnommen, sagitale Kryoschnitte angefertigt und mit Antikörpern gegen CD11b, CD11c, MHCII und dem Proliferationsmarker Ki-67 angefärbt. Mit Hilfe der Immunhistochemie lässt sich nachvollziehen, wo die positiven Zellen im Gehirn lokalisiert sind. Es wurden verschiedene Vergrößerungen angefertigt. Die Vergrößerung mit dem 2,5-fachen Objektiv diente dazu, einen generellen Überblick über die betroffene Gehirnregion und den Stichkanal zu erhalten. Für die genauere

Darstellung der Morphologie einzelner Zellen wurden zusätzlich Vergrößerungen mit dem 10-fachen und 40-fachen Objektiv abgebildet. Dabei zeigt die obere Reihe der Bilder mit dem 40-fachen Objektiv einen Ausschnitt des Stichkanals, in der unteren Reihe sind präferentiell Gefäße in der Region unterhalb des Stichkanals dargestellt, also tiefer im Hirngewebe mit Konzentration auf die perivaskulären Gefäße.

In Abb. 26 wurde zunächst die Verteilung der CD11b<sup>+</sup> Zellen analysiert. Wie auch schon in der Durchflusszytometrie beobachtet, sind auch Mikroglia positiv für CD11b.



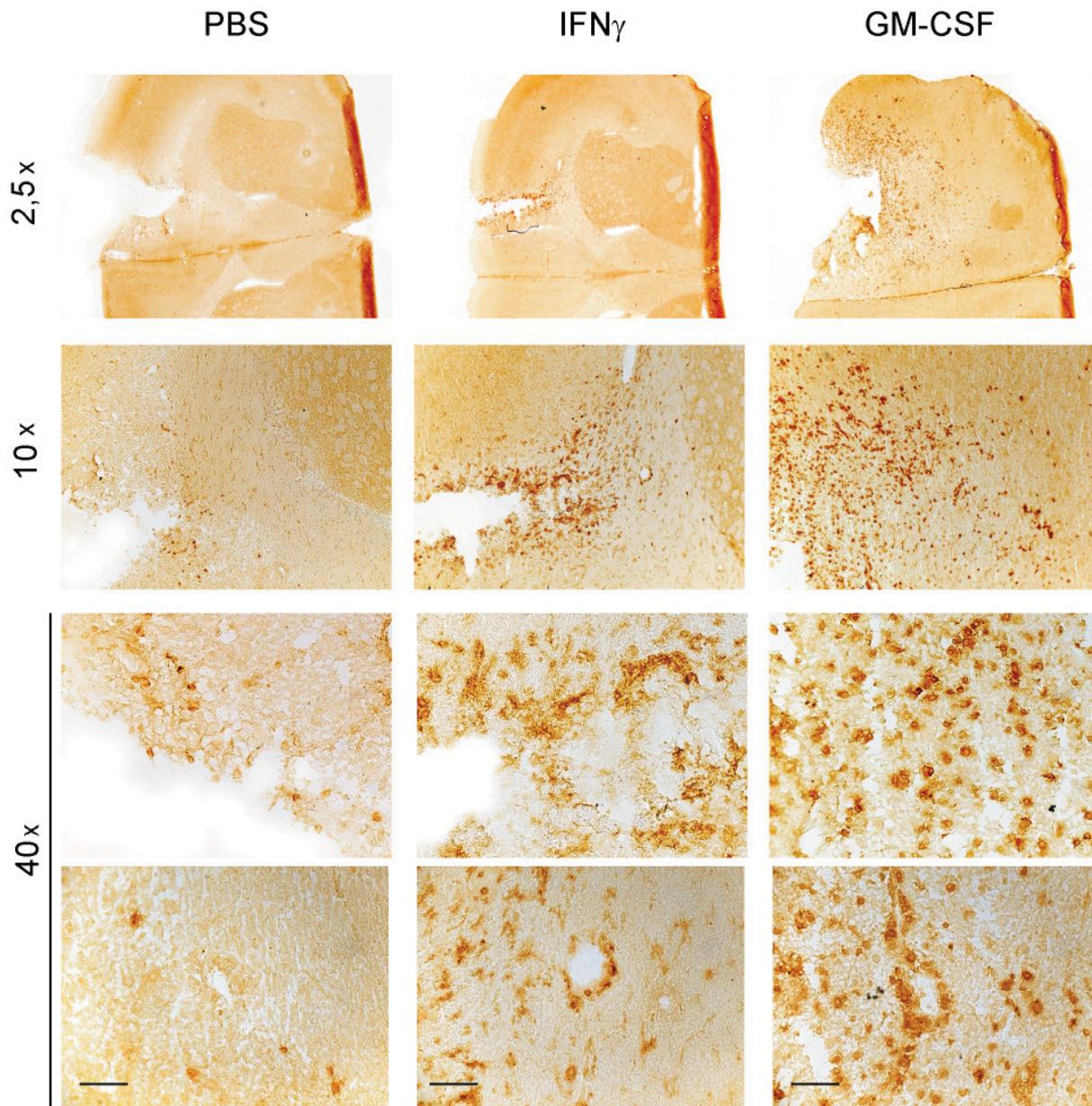
**Abb. 26: Vermehrte Zahl CD11b<sup>+</sup> Zellen in der Region der GM-CSF Infusion.**

An Tag 6 der i.c.v. Behandlung wurden die Tiere schmerzfrei getötet, das Gehirn entnommen und schockgefroren. 10  $\mu$ m dicke Kryoschnitte wurden angefertigt und mit  $\alpha$ CD11b-Ak gefärbt. Abgebildet sind die Gehirnhälften nach PBS- oder Zytokininfusion mit den angegebenen Objektiven. Die Skalierungsbalken in der größten Vergrößerung entsprechen 40 $\mu$ m.

Die Morphologie der Mikroglia ließ sich mittels CD11b<sup>+</sup> Färbung im Hirngewebe deutlich darstellen. Sie waren deutlich an ihrer weitverzweigten Form zu erkennen. In den PBS behandelten Tieren waren um den Stichkanal ebenfalls einige Zellen mit abgerundeter Morphologie zu sehen. Jedoch waren keine perivaskulären Infiltrate zu erkennen, es zeigte sich kaum eine CD11b Immunreaktivität um die Gefäße. In IFN $\gamma$  behandelten Tieren war die allgemeine Immunreaktion leicht erhöht. Um den Stichkanal traten vermehrt abgerundete CD11b<sup>+</sup> Zellen auf, aber auch hier waren kaum perivaskuläre Infiltrate nachzuweisen. Sämtliche Zellen um die Gefäße herum waren ausgestreckt und verzweigt, was auf lokale Mikroglia hindeutet. In GM-CSF behandelten Tieren war das Hirngewebe weicher, wodurch die Kryoschnitte sehr viel schwieriger anzufertigen waren. Hier war die Region um den Stichkanal oft ausgerissen und dadurch vergrößert. Die Immunreaktion war bei GM-CSF Behandlung um den Stichkanal am größten. CD11b<sup>+</sup> Zellen zeichneten sich durch eine abgerundete Morphologie aus. Sie waren auch noch in tieferen Gehirnregionen zu sehen. In der Region um die Gefäße waren ebenfalls deutliche Anreicherungen abgerundeter Zellen zu sehen.

In der durchflusszytometrischen Analyse hatte sich gezeigt, dass die CD45<sup>high</sup> Zellen zum Großteil auch CD11c<sup>+</sup> exprimierten. Auch in der Immunhistologie lies sich der deutliche Anstieg an CD11c<sup>+</sup> Zellen nachweisen (Abb. 27).

In den Schnitten von Gehirnen aus PBS behandelter Tiere ließen sich kaum CD11c<sup>+</sup> Zellen nachweisen. Nach IFN $\gamma$  Behandlung waren einige CD11c<sup>+</sup> Zellen nachweisbar, und diese sowohl um den Stichkanal als auch im ZNS-parenchym in der Region um die Gefäße. Deutlicher zeigte sich dies allerdings nach GM-CSF Behandlung. In der Übersicht sieht man, dass sich die CD11c Immunreaktivität über große Teile der ipsilateralen Hemisphäre erstreckte, wohingegen kaum Immunreaktivität in der kontralateralen Hemisphäre zu sehen war (Daten nicht gezeigt). Bei Analyse der höheren Vergrößerungen wird deutlich, dass die CD11c Färbung besonders Zellen mit abgerundeter Morphologie anfärbte. Diese Zellen waren sowohl in der Nähe des Stichkanals als auch in direkter Nähe der Gefäße im ZNS-parenchym zu finden. Die durch die i.c.v. Behandlung mit GM-CSF induzierten perivaskulären Infiltrate zeigten also eine deutlich Immunreaktivität für CD11c, während in den mit IFN $\gamma$  behandelten Tieren diese perivaskulären Infiltrate nur vereinzelt zu beobachten waren. Bei keiner der Behandlungen waren CD11c<sup>+</sup> Zellen mit weitausgestreckter Morphologie nachweisbar.

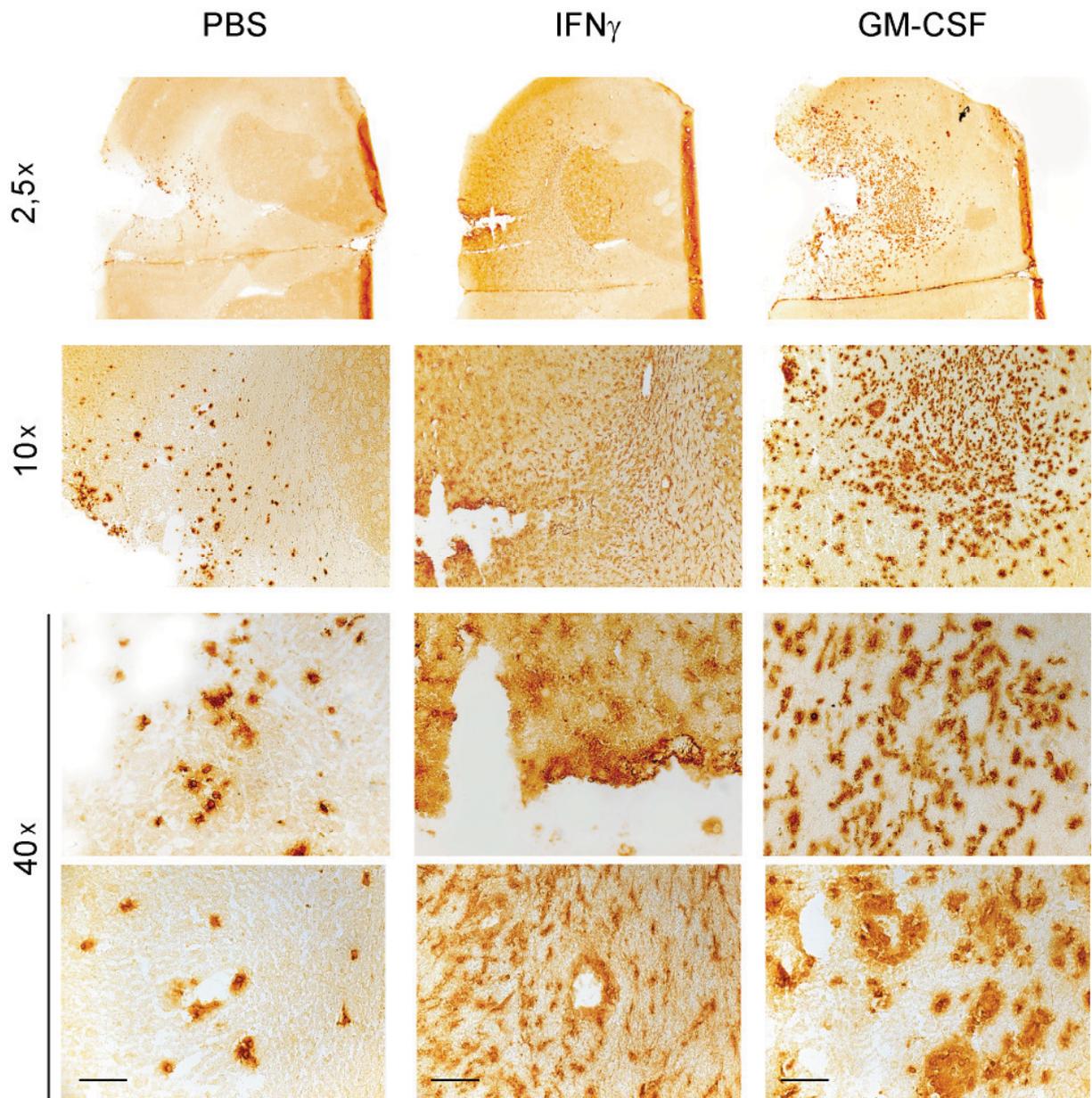


**Abb. 27: Lokale Zunahme von CD11c<sup>+</sup> ICL mit abgerundeter Morphologie nach i.c.v. GM-CSF Gabe**

An Tag 6 der i.c.v. Behandlung wurden die Tiere schmerzfrei getötet, das Gehirn entnommen und schockgefroren. 10  $\mu$ m dicke Kryoschnitte wurden angefertigt und mit  $\alpha$ CD11cAk gefärbt. Abgebildet sind die Gehirnhälften nach PBS- oder Zytokininfusion mit den angegebenen Objektiven. Die Skalierungsbalken in der größten Vergrößerung entsprechen 40 $\mu$ m.

Zur Charakterisierung des Aktivierungsstatus der infiltrierenden Zellen wurden die Schnitte ebenfalls mit  $\alpha$ MHCII-Ak gefärbt (Abb. 28). Bei PBS behandelten Tieren waren in den Hirnschnitten nur wenige MHCII<sup>+</sup> Zellen detektierbar. Nach der Behandlung mit IFN $\gamma$  war zusätzlich eine deutliche Anzahl der ausgestreckten Zellen MHCII<sup>+</sup>. Allerdings waren diese Zellen weniger stark angefärbt als Zellen mit einer abgerundeter Morphologie. Ebenfalls positiv für MHCII waren einige Zellen in der Gegend um die Gefäße. In GM-CSF behandelten Tieren hingegen zeigte sich eine sehr starke Immunreaktivität um den Stichkanal herum und auch die

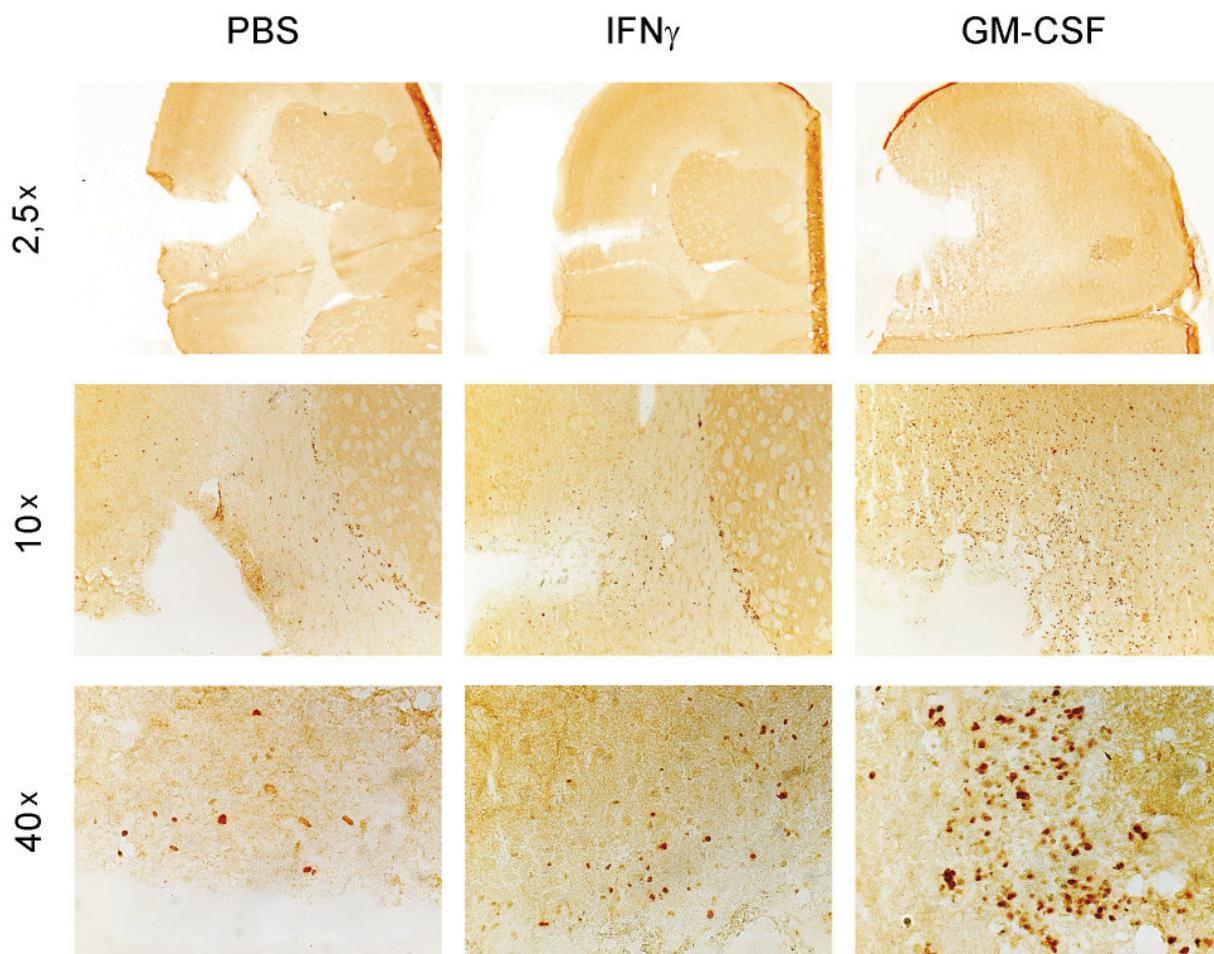
perivaskulären Infiltrate waren sehr deutlich positiv für MHCII. Die Zellen wiesen eine abgerundete Morphologie auf. Die histologischen Schnitte unterstreichen also die Daten der Durchflusszytometrie. Die i.c.v. Behandlung mit GM-CSF induziert die Anwesenheit infiltrierender myeloider Zellen im Gehirn, die präferentiell DC der myeloiden Linie mit signifikanter MHCII Expression waren. Dabei sind die infiltrierenden Zellen vorzugsweise lokalisiert am Ort der Applikation von GM-CSF.



**Abb. 28: Erhöhte Immunreaktivität gegen MHCII nach i.c.v. GM-CSF Gabe**

An Tag 6 der i.c.v. Behandlung wurden die Tiere schmerzfrei getötet, das Gehirn entnommen und schockgefroren. 10  $\mu$ m dicke Kryoschnitte wurden angefertigt und mit  $\alpha$ MHCII-Ak gefärbt. Abgebildet sind die Gehirnhälften nach PBS- oder Zytokininfusion mit den angegebenen Objektiven. Die Skalierungsbalken in der größten Vergrößerung entsprechen 40 $\mu$ m.

Mit den Experimenten ist nicht geklärt, wie die infiltrierenden Zellen an den Applikationsort des GM-CSF gelangen. Es gibt hierfür mehrere denkbare Szenarien. Zum einen könnten Zellen aus der Peripherie in das Gehirn rekrutiert werden. Ergänzend dazu ist es auch denkbar, dass Vorläuferzellen oder unreife Zellen rekrutiert werden, die dann vor Ort im Gehirn weiter proliferieren. Auch die Proliferation von vorab aktivierten Zellen ist denkbar, die vor Ort weiter proliferieren. Einen Hinweis darauf sollte die Färbung mit  $\alpha$ Ki67-Ak liefern. Ki67 ist ein Proliferationsmarker, der den Zellkern sich teilender Zellen anfärbt.



**Abb. 29: GM-CSF i.c.v. induziert Ki67 Immunreaktivität im Gehirn**

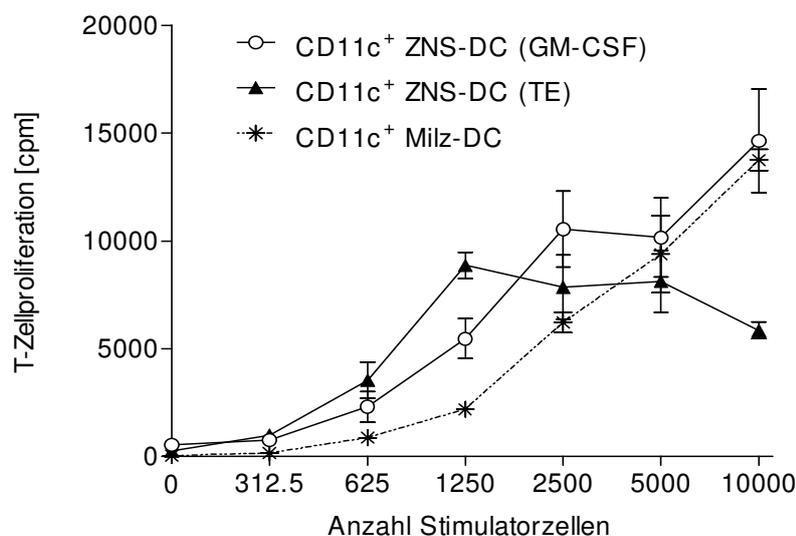
An Tag 6 der i.c.v. Behandlung wurden die Tiere schmerzfrei getötet, das Gehirn entnommen und schockgefroren. 10  $\mu$ m dicke Kryoschnitte wurden angefertigt und mit  $\alpha$ Ki67-Ak gefärbt. Abgebildet sind die Gehirnhälften nach PBS- oder Zytokininfusion mit den angegebenen Objektiven. Die Skalierungsbalken in der größten Vergrößerung entsprechen 40 $\mu$ m.

Abb. 29 zeigt, dass bei den Färbungen der Schnitte aus PBS und IFN $\gamma$  behandelten Mäusen kaum sich teilende Zellen detektierbar waren, nach GM-CSF Gabe hingegen war in der Region um den Stichkanal eine deutliche Immunreaktivität zu beobachten. Die Applikation von GM-CSF im Gehirn induziert also nicht nur die Anwesenheit myeloider Zellen aus der Peripherie mit dem

beschriebenen Reifungsgrad, sie resultiert auch in der Teilung der Zellen im Gehirn. Welche Morphologie diese Zellen aufweisen, läßt sich allerdings mit der Ki-67 Färbung nicht nachweisen, da Ki67 nur den Zellkern anfärbt und die Morphologie der Zellen damit nicht darstellbar war.

### 2.3 Funktionelle Charakterisierung der DC im ZNS

Abschließend sollte geklärt werden, ob die ICL nach GM-CSF Behandlung, die nachweislich eine hohe Expression kostimulatorischer Moleküle aufwies, auch funktionelle Eigenschaften der APC besitzen. Um die allostimulatorische Kapazität der ICL nach GM-CSF Behandlung zu testen, wurden CD11c<sup>+</sup> ICL auf ihre Fähigkeit hin untersucht, naive T-Zellen in der MLR zur Proliferation zu bringen. CD11c<sup>+</sup> ICL aus *T. gondii* infizierten Mäusen dienten dabei als Positivkontrolle, da die Infektion mit *T. gondii* im Gehirn aktivierte ZNS-DC mit allostimulatorischer Aktivität induziert (Fischer und Reichmann, 2001).



**Abb. 30: Allostimulatorische Aktivität von CD11c<sup>+</sup> ICL nach i.c.v. GM-CSF Gabe**

CD11c<sup>+</sup> ICL wurden aus Gehirnen von Mäusen nach i.c.v. GM-CSF Behandlung oder von Mäusen mit chronischer *T. gondii* Infektion (TE) aufgereinigt. Kontroll-APC wurden aufgereinigt aus Milzen unbehandelter Mäuse. Die verschiedenen APC wurden in einer MLR mit aufgereinigten allogenen BALB/c T-Zellen für 5 Tage kokultiviert. T-Zellproliferation wurde durch Zugabe von radioaktiv markiertem <sup>3</sup>H-TdR in den letzten 24h der Kultur gemessen.

Die CD11c<sup>+</sup> ICL von GM-CSF behandelten Mäusen induzieren eine starke Proliferation alloreaktiver T-Zellen (Abb. 30). ICL von Mäusen mit Toxoplasmaenzephalitis (TE) und nach GM-CSF Behandlung waren vergleichbar gute Stimulatorzellen wie Milz-DC von Kontrollmäusen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse erstmalig, dass GM-CSF im Gehirn auch ohne zusätzliche inflammatorische Stimuli die Anwesenheit vollständig kompetenter DC im Gehirn induziert.

### III Diskussion

#### 1.1 Einfluss von GM-CSF auf BALB/c Mikroglia *in vitro*

Mikroglia teilen aufgrund ihres myeloiden Ursprungs viele Charakteristika von Subpopulationen peripherer myeloider Zellen. Die *ex vivo* Präparation von Mikroglia ist aufgrund der stark verzweigten Morphologie mit nur einer geringen Ausbeute möglich. Daher wurde zunächst eine neonatale Gliakultur etabliert, die die Analyse der GM-CSF Wirkung auf Mikroglia ermöglichte. Obwohl die detaillierte durchflusszytometrische Analyse von GM-CSF differenzierter Mikroglia der beiden untersuchten Mausstämmen - BALB/c und C57BL/6 - keine Unterschiede ergab, zeigte die anschließende funktionelle Charakterisierung sehr gegensätzliche Fähigkeiten von Mikroglia aus BALB/c verglichen mit C57BL/6 Mikroglia bei der Aktivierung von T-Zellen.

Die neonatale Gliakultur ermöglicht die Kultivierung von Astrozyten und Mikroglia (Re et al., 2002). Die konstitutive Expression von M-CSF durch Astrozyten verhindert jedoch eine Ausdifferenzierung der Mikroglia in Richtung DC. In Anwesenheit von M-CSF sind neonatale Mikroglia vergleichbar mit Makrophagen, sie exprimieren ein Makrophagen-ähnliches Genprofil, haben keine T-Zell-stimulatorische Kapazität und sind CD11c<sup>+</sup> (Re et al., 2002). Setzt man diesen Kulturen GM-CSF zu, so differenzieren neonatale Mikroglia *in vitro* zu CD11c<sup>+</sup> DC mit einem unreifen Phänotyp (Fischer und Reichmann, 2001; Santambrogio et al., 2001). Deshalb gelten Mikroglia als nicht vollständig ausdifferenzierte Vorläuferzellen. In dieser Arbeit wurde dieser DC-ähnliche Phänotyp eingehend charakterisiert. Die Mikroglia ähneln morphologisch unreifen DC und exprimieren typische Oberflächenmoleküle unreifer DC. Sie weisen nur eine geringe Expression von CD80 und MHCII auf und sind negativ für CD40 und CD86. Die MHCII Expression lässt sich wie auch bei DC am deutlichsten mit IFN $\gamma$  induzieren, während LPS Stimulation und vor allem die synergistische Stimulation mit IFN $\gamma$  und LPS eine klare Expressionssteigerung von CD40 und CD86 induziert (Carreno und Carrens, 2002). Damit sind die Mikroglia in der Lage, T-Zellen Antigen zu präsentieren und diese zu stimulieren. Diese wesentliche Eigenschaft reifer DC kann in der MLR getestet werden. Die dazu verwendeten allogenen naiven T-Zellen benötigen eine starke Kostimulation zusammen mit MHCII Expression, um aktiviert zu werden und zu proliferieren (Lenschow et al., 1996). Interessanterweise zeigte die MLR mit LPS und synergistisch stimulierter Mikroglia aus BALB/c Mäusen eine vergleichbar

starke Proliferation wie mit Milzkontrollzellen, während unstimulierte Mikroglia oder Mikroglia nach IFN $\gamma$  Stimulation keine T-Zellantwort induzieren. In IFN $\gamma$  stimulierter Mikroglia ist die alleinige starke Expression von MHCII Molekülen ohne die Expression kostimulatorischer Moleküle nicht ausreichend, um naive T-Zellen zu aktivieren. Die Proliferation bereits aktivierter T-Zellen ist hingegen weniger stark abhängig vom Kostimulus, sondern besonders auf eine starke MHCII Expression angewiesen (Croft, 1994). Die MHCII Expression wird besonders durch die Stimulation mit IFN $\gamma$  bzw. LPS+IFN $\gamma$  induziert. Deshalb ist die Aktivierung geprimter T-Zellen am stärksten, wenn sie in Anwesenheit des benötigten Antigens mit IFN $\gamma$  bzw. LPS/IFN $\gamma$  stimulierter BALB/c Mikroglia kultiviert werden. GM-CSF differenzierte BALB/c Mikroglia sind also nicht nur phänotypisch vergleichbar mit unreifen DC, sondern teilen nach Reifung auch deren wichtigste funktionelle Eigenschaften.

## 1.2 Einfluss von GM-CSF auf C57BL/6 Mikroglia *in vitro*

Auch bei C57BL/6 Mäusen weisen die GM-CSF differenzierten Mikroglia einen DC-ähnlichen morphologischen Phänotyp auf und exprimieren vergleichbare Mengen der untersuchten kostimulatorischen Moleküle und MHCII. In GM-CSF differenzierter C57BL/6 Mikroglia ist eine deutliche CD11c Expression zu beobachten. Die Mikroglia zeigten eine mit BALB/c Mikroglia vergleichbar starke Expression der MHCII Moleküle nach IFN $\gamma$  Stimulation und die Expression von CD40 und CD80 lässt sich durch LPS Stimulation induzieren. Gemessen an der Expression von MHCII und der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 war eine T-Zell-stimulatorische Aktivität zu erwarten. Dennoch kann überraschenderweise mit C57BL/6 Mikroglia keine T-Zellstimulation beobachtet werden. Das Fehlen der T-Zellaktivierung ist dabei unabhängig von der Stimulation der Mikroglia und auch unabhängig davon, ob naive oder voraktivierte T-Zellen untersucht werden. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Widerspruch zu ihrem DC-Phänotyp. Neben den bereits früher etablierten DC Populationen mit ihren unreifen und reifen Differenzierungsstadien sind mittlerweile auch regulatorische DC beschrieben (Steinman et al., 2003). Deshalb wurde nachfolgend untersucht, ob Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen die Proliferation von T-Zellen inhibieren können.

Werden die Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen mit einer funktionierenden T-Zellproliferation kokultiviert, so sind sie in der Lage, die T-Zellproliferation zu unterdrücken. Diese inhibitorische

Eigenschaft der Mikroglia ist dabei unabhängig von der verwendeten APC-Population. Mikroglia inhibieren die T-Zellproliferation eines T-Zellklons induziert durch Milzzellen genauso wie die allogene Reaktion der T-Zellen auf Milz-DC und DC generiert aus Knochenmark. Die Inhibition ist dabei unabhängig vom Reifungszustand der Mikroglia. LPS gereifte Mikroglia inhibieren die T-Zellproliferation genauso wie unstimulierte Mikroglia.

### 1.3 Mausstamm-spezifische Unterschiede der Mikroglia

In der Literatur sind stimulatorische Eigenschaften bisher für *in vitro* differenzierte Mikroglia aus BALB/c und SJL Mäusen beschrieben (Fischer und Reichmann, 2001; Re et al., 2002). Mit den Untersuchungen der verschiedenen Mausstämmen sollte geklärt werden, ob GM-CSF-differenzierte Mikroglia generell eher T-Zell-stimulatorisch oder -inhibitorisch wirken. Es wurden deshalb Mikroglia aus verschiedenen Mäusstämmen hinsichtlich ihrer stimulatorischen vs. inhibitorischen Eigenschaften untersucht. Die stimulatorischen Eigenschaften der Mikroglia lässt sich in BALB/c Mäusen bestätigen, während die inhibitorische Kapazität für C57BL/6 und 129 Mikroglia zu beobachten ist. Eine besondere Rolle nimmt der Mausstamm FVB ein. FVB Mikroglia verhalten sich völlig inert in der Anwesenheit allogener T-Zellen, egal ob die T-Zellen durch andere APC stimuliert sind oder nicht; sie sind weder inhibitorisch noch stimulatorisch. Ob die verschiedenen Haplotypen des MHC-Lokus bei den Eigenschaften der Mikroglia eine Rolle spielt, kann nicht geklärt werden. Interessanterweise aber haben sowohl 129 als auch C57BL/6 Mikroglia, die beide MHCII im b-Haplotyp tragen, inhibitorische Kapazität auf T-Zellen. Die Kreuzung von BALB/c und C57BL/6 Mäusen (F1-Generation) zeigt, dass der stimulatorische Phänotyp der Mikroglia in der F1 Generation nicht zu finden ist. Allerdings sind die inhibitorischen Eigenschaften der Mikroglia nicht mehr so stark ausgeprägt. Unabhängig vom Aktivierungszustand der Mikroglia lässt sich die T-Zellproliferation nicht mehr komplett hemmen. Damit ist der inhibitorische C57BL/6 Phänotyp gegenüber dem stimulatorischen Phänotyp der BALB/c Mäuse der dominante. Betrachtet man die sehr unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Inzuchtstämmen miteinander, so ist die Varianz der Mikroglieeigenschaften möglicherweise erklärbar. Dies hat Relevanz für die Beurteilung anderer Untersuchungen, da der Mausstamm großen Einfluss auf die Mikroglia haben kann. Diese bemerkenswerten Unterschiede sollten in zukünftigen Projekten berücksichtigt werden.

Es ist lange bekannt, dass sich Mausstämmen in ihrem Zytokinprofil und damit in der Tendenz zu verschiedenen  $T_H$  Antworten unterscheiden können. Dies wird am Beispiel der Infektion mit *Leishmania major* deutlich. Während C57BL/6 Mäuse nach Infektion mit dem Parasiten eine protektive  $T_H1$  Antwort durch IFN $\gamma$  vermittelt aufbauen, kommt es in BALB/c Mäusen zur IL-4 und damit eher  $T_H2$  gerichteten Immunantwort, die zum progressiven Krankheitsverlauf führt (von Stebut und Udey, 2004). Auch in anderen Infektionsmodellen gibt es klare Unterschiede zwischen den Mausstämmen. Bei der Infektion mit dem Malariaerreger *Plasmodium chabaudi* sind C57BL/6 Mäuse ebenfalls resistent, und BALB/c Mäuse suszeptibel, obwohl hier die genetischen Grundlagen für diese Unterschiede noch nicht bekannt sind (Fortin et al., 2002). Die Infektion mit *T. gondii* verläuft bei C57BL/6 Mäusen in der chronischen Phase der Infektion letal, die resistenten BALB/c Mäuse überleben hingegen (Suzuki et al., 1994). Hier konnte das Fehlen des H-2L<sup>d</sup> Gens, ein Gen im MHCII Lokus, für die unterschiedliche Suszeptibilität verantwortlich gemacht werden (Brown et al., 1995). Gerade in komplexen Krankheiten reagieren verschiedene Mausstämmen also sehr unterschiedlich.

Es ist möglich, dass Mikroglia so zur Immunaktivierung oder zur Aufrechterhaltung des "immune privilege" im ZNS beitragen. Allerdings ist der Vergleich *in vitro* differenzierter Mikroglia mit der tatsächlichen Situation *in vivo* schwierig. Die hier untersuchten Mikroglia werden lange kultiviert, um sie in ausreichender Menge zu generieren und ihre DC-Differenzierung zu induzieren. Folglich ist es zwar möglich, Mikroglia mit einem DC-ähnlichen Phänotyp zu erhalten, welche Relevanz dies *in vivo* hat, kann nur spekuliert werden. Es ist denkbar, dass die lange Anwesenheit von GM-CSF im ZNS z.B. bei chronischen Entzündungsreaktionen auch *in vivo* die Differenzierung von Mikroglia lenken kann. Bekannt ist, dass Mikroglia sehr schnell eine als Mikrogliose bezeichnete Reaktion auf Veränderungen der ZNS-Homöostase zeigen. Diese Aktivierung der Mikroglia ist teilweise auch nach Wochen noch zu beobachten (Streit et al., 1999). Damit wäre zumindest in einigen Mausstämmen ein zusätzlicher Mechanismus gegeben, den besonderen Immunstatus des ZNS zu moderieren.

#### 1.4 Charakterisierung inhibitorischer Mikroglia *in vitro*

Die T-Zell-inhibitorische Aktivität der C57BL/6 Mikroglia zeigt sich unabhängig von der APC Population, die die T-Zellproliferation auslöst und wurde mit inhibitorischer Mikroglia weiter untersucht. Dazu wurde der APC-Stimulus ersetzt durch eine direkte Aktivierung der T-Zellen

am T-Zellrezeptor. Bei der physiologischen Stimulation des T-Zellrezeptors werden die T-Zellrezeptorkomplexe in der immunologischen Synapse auf einen Punkt an der Oberfläche konzentriert, wodurch das Signal weitergeleitet wird. Diese Stimulation kann auch erreicht werden, wenn der T-Zellrezeptor mit einem T-Zellrezeptor spezifischen Antikörper ( $\alpha$ CD3) an eine Mikrotiterplatte gebunden kreuzvernetzt wird. Ersetzt man die aktivierende APC durch diesen T-Zellstimulus, so ist keine inhibitorische Aktivität der C57BL/6 Mikroglia mehr zu beobachten. Dabei war die Stärke der  $\alpha$ CD3 Stimulation so gewählt, dass sie den vorigen Stimulationen mit Milzzellen oder BM-DC entsprach und eine vergleichbare T-Zellproliferation induzierte (ca 20.000 cpm). Damit sollte verhindert werden, dass der Stimulus durch  $\alpha$ CD3 so stark gesetzt wurde, dass die T-Zellproliferation von den Mikroglia aufgrund der unphysiologischen hohen Intensität nicht mehr reduziert werden konnte. Ersetzt man also die APC durch einen anderen Stimulus, so sind die Mikroglia nicht mehr in der Lage, die Proliferation der T-Zellen zu unterdrücken. Die Beobachtungen belegen, dass die Hemmung wahrscheinlich über eine Veränderung der stimulatorischen APC vermittelt wird, und nicht über den direkten Kontakt der Mikroglia mit der T-Zelle.

Um den Mechanismus der Hemmung über einen direkten Zell-Zellkontakt zu untersuchen, wurden Experimente im Transwellssystem durchgeführt. Damit waren die Mikroglia über eine Membran mit einer Porengröße von 0,4  $\mu$ m von den T-Zellen getrennt. Ohne direkten Zellkontakt sind Mikroglia nicht in der Lage, die Hemmung zu vermitteln. Die Hemmung ist also zwingend kontaktabhängig. Während Suter und Kollegen IL-10 und TGF $\beta$  für die T-Zell-inhibitorische Wirkung von akut isolierten ZNS-DC aus C57BL/6 Mäusen mit EAE verantwortlich machen (Suter et al., 2003), spielen diese löslichen Faktoren hier vermutlich keine Rolle. Auch eineIDO-abhängige T-Zellhemmung (Mellor und Munn, 2004) ist genauso wie die Hemmung über Stickstoffmonoxidradikale produziert durch das induzierbare Enzym iNOS (van der Veen, 2001) eher unwahrscheinlich, da es sich hier ebenfalls um lösliche Faktoren handelt. Diese Hypothese wird durch Real-Time PCR-Analysen bestätigt. Vergleicht man die relative Expression der vier oben genannten Gene, so kann für keinen der Kandidaten eine deutliche Transkriptionssteigerung über alle Stimulationsbedingungen hinweg beobachtet werden. Eine höhere Transkriptmenge in allen Stimulationsbedingungen bei C57BL/6 Mikroglia wäre aber zu erwarten gewesen, wenn man bedenkt, dass die getesteten C57BL/6 Mikroglia unabhängig von der Stimulation inhibitorisch auf T-Zellen wirkten.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus der Inhibition könnte die Immunregulation über die Induktion von Apoptose in T-Zellen sein. Deshalb wurde untersucht, inwieweit die Apoptose bei der Hemmung durch C57BL/6 Mikroglia eine Rolle spielt. Apoptose kann durch mehrere Moleküle induziert werden. Im Gehirn findet man die Apoptose auslösenden Mitglieder der TNF-Superfamilie FasLigand (Becher et al., 1998) und TRAIL (Fanger et al., 1999). Daneben ist auch PD-1, ein Mitglied der B7-Familie, als Apoptose-auslösender Rezeptor bekannt (Greenwald et al., 2005). Aber sowohl die Expressionsanalyse der PD-1 Liganden wie auch der Expressionsvergleich von TRAIL zeigt keine Unterschiede in der Expression bei den beiden Mausstämmen. Auch die Real-Time PCR-Analyse der FasLigand Expression wurde durchgeführt. Hierbei zeigt sich jedoch, dass sich bei beiden Mausstämmen unter den gewählten Stimulationsbedingungen die Expression von FasLigand nicht nachweisen lässt. Die inhibitorischen Eigenschaften der C57BL/6 Mikroglia werden indirekt vermittelt und sind kontaktabhängig. Welcher Mechanismus allerdings für die T-Zellinhibition verantwortlich ist, konnte durch die bisher durchgeführten Experimente nicht ausreichend beantwortet werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die Hemmung je nach Stimulation der Mikroglia durch unterschiedliche Faktoren vermittelt wird oder einige Faktoren synergistisch wirken. Eine geringfügig höhere Expression von iNOS und CD200R2 ist zum Beispiel bei unstimulierter C57BL/6 Mikroglia im Vergleich mit BALB/c Mikroglia zu beobachten. Die Expression von PD-L2 ist in LPS stimulierter C57BL/6 Mikroglia erhöht gegenüber unstimulierter BALB/c Mikroglia. Inwieweit die angesprochenen Mechanismen doch additiv wirken oder nur auf einzelne Stimulationsbedingungen der C57BL/6 Mikroglia zutreffen, bleibt zu klären.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kandidaten IDO, iNOS, IL-10 und TGF $\beta$ , die PD-Liganden und CD200R-Familie und die Apoptose vermittelnden Moleküle FasLigand und TRAIL sind jedoch einzeln betrachtet nicht für die Hemmung nach verschiedenen Stimulation verantwortlich. Allerdings sollten die Untersuchungen noch durch geeignete Antikörper, die die Interaktion dieser Moleküle trennen, untersucht werden, da auch translationale Effekte vorhanden sein können. Andere Faktoren, die hier noch nicht untersucht wurden, scheinen die Hemmung zu vermitteln.

Eine mögliche weitere Vorgehensweise könnten Mikroarrayanalysen bieten. Mikroarrayanalysen erlauben es, die gesamte transkriptionelle Regulation von Genen innerhalb von Zellpopulationen oder Geweben zu untersuchen. Durch Vergleich von Mikroglia aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen könnten mit Hilfe dieser Technik differentiell regulierte Gene gefunden werden, indem aus

beiden Zellpopulationen RNA aufgereinigt und über Mikroarrays quantifiziert wird. Die mittlerweile erhältlichen Mikroarrays erlauben dabei eine weitgreifende Analyse des Transkriptoms. Dies wäre ein möglicher experimenteller Ansatz, die transkriptionellen Unterschiede zwischen Mikroglia der beiden Mausstämme aufzuklären.

## 2.1 GM-CSF induziert die Anwesenheit funktionell kompetenter DC *in vivo*

GM-CSF ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor und inflammatorisches Zytokin. Interessanterweise ist es im Gehirn während chronischen Inflammationen zu finden (Franzen et al., 2004). Dennoch ist wenig über GM-CSF in diesem spezialisierten Immunkompartiment in der Abwesenheit inflammatorischer Stimuli wie TLR Liganden oder zusätzlicher Zytokine, die z. B. während Infektionen oder autoimmuner Erkrankung auftreten, bekannt. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Funktion des proinflammatorischen Zytokins *in vivo* unter „steady-state“, d.h. nicht inflammatorischer Bedingungen getestet.

Durch die i.c.v. Gabe von GM-CSF ist selbst in Abwesenheit anderer inflammatorischer Stimuli im Gehirn ein massiver Anstieg von myeloiden Zellen zu beobachten. Der Großteil dieser myeloiden Zellen exprimiert CD11c, und die Expression kostimulatorischer Moleküle und MHCII entspricht dem Phänotyp teilweise aktivierter DC.

Weniger spezifische frühere Studien haben den Einfluss von systemischer GM-CSF Gabe auf das Immunsystem untersucht. GM-CSF wurde hier durch die kontinuierliche Infusion oder über adenoviralen Gentransfer in die Peripherie appliziert. Intravenöse Infusion von GM-CSF über sieben Tage hinweg induzierte in der Milz, dem Blut und den LN eine starke Zunahme der CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> Population (Basak et al., 2002). In diesen Studien wurde durch den adenoviralen Transfer des Gens GM-CSF lokal im Muskel, der Lunge oder im Magengewebe exprimiert und induzierte die Rekrutierung myeloider DC in diesen Geweben (Burger et al., 2000; Wang et al., 2000; Biondo et al., 2001). Diese durch GM-CSF induzierten Zellen waren phänotypisch vergleichbar mit denen in der vorliegenden Arbeit charakterisierten ZNS-DC. Sie exprimierten eine hohe Menge MHCII und CD80 auf der Oberfläche, zeigten jedoch nur eine geringe Expression von CD86 und CD40 (Wang et al., 2000; Miller et al., 2002). Die GM-CSF induzierten DC waren funktionell mit reifen DC zu vergleichen, sie zeigten eine verstärkte stimulatorische Kapazität bei der Erstaktivierung naiver T-Zellen (Basak et al., 2002; Miller et al., 2002). Diese stimulatorische Kapazität weisen in der vorliegenden Arbeit auch ZNS-DC *ex vivo* nach GM-CSF

Applikation im Gehirn auf und sind damit genauso effizient wie die zum Vergleich eingesetzten Milz-DC. Damit wurde erstmalig GM-CSF direkt ins ZNS appliziert und mit der Applikation von IFN $\gamma$  verglichen, so dass dadurch der spezifische Einfluss von GM-CSF gegenüber dem proinflammatorischen Zytokin IFN $\gamma$  abgegrenzt werden kann. Das bemerkenswerte ist, dass bereits die Anwesenheit von GM-CSF im ZNS ausreicht, um funktionelle DC im Gehirn zu induzieren – auch ohne Infektion oder Autoimmunität. Ob diese DC eher endogen differenzieren oder rekrutiert werden ist dabei noch unklar. Diese Fragestellung könnte durch den Einsatz von knochenmarkschimären Mäusen adressiert werden (siehe Abschnitt 2.2).

Die Experimente zur i.c.v. Behandlung mit GM-CSF unterstreichen den wichtigen und bisher nicht bekannten Einfluss von GM-CSF bei der Entwicklung von Immunsystem-medierten Erkrankungen des ZNS, bei denen DC eine entscheidende Rolle spielen. Die alleinige Stimulation durch GM-CSF reicht also auch im immunprivilegierten Gehirn aus, um funktionell kompetente DC zu induzieren.

Die Expression von GM-CSF ist unter diversen inflammatorischen Bedingungen hochreguliert. In der chronischen Phase einer *T. gondii* Infektion sind im Gehirn reife DC zu finden, die ebenfalls in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren (Fischer et al., 2000). In der akuten Phase der MS ist eine erhöhte Menge von GM-CSF im Liquor zu finden (Carrieri et al., 1998). Im Gegensatz jedoch zu den Ergebnissen der Toxoplasmeninfektion wiesen ZNS-DC aus Mäusen mit EAE einen unreifen Phänotyp aus, welcher durch die geringe Expression von MHCII und kostimulatorischen Liganden charakterisiert ist. ZNS-DC aus EAE Mäusen inhibierten die Proliferation naiver T-Zellen (Suter et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass GM-CSF auch ohne weitere inflammatorische Stimuli DC eines aktivierten Phänotyps induziert. Es ist unklar, welche Faktoren den Reifestatus der ZNS-DC bestimmen; es ist jedoch gut möglich, dass die Modulation der DC Funktion im ZNS abhängig ist von der jeweils vorliegenden ZNS Umgebung und dem damit verbundenen Zytokinmilieu. Während GM-CSF alleine ausreicht, um die Anwesenheit von DC auch im ZNS zu induzieren, werden unter komplexen inflammatorischen Bedingungen je nach Immunaktivierung diese DC im ZNS möglicherweise so differenziert, dass sie damit im Gehirn Immunreaktionen unterstützen oder inhibieren. Ob dadurch schützende oder schädliche Effekte erzielt werden, hängt von der jeweiligen Situation ab. Denkbar wäre ebenfalls, dass die chronische Anwesenheit von GM-CSF zu Autoimmunität führen kann; diese Situation ist durch die begrenzte Funktionsdauer der osmotischen Pumpe leider nicht experimentell darstellbar (siehe auch Abschnitt 2.2)

Zusammengefasst unterstreichen diese Befunde die Bedeutung von GM-CSF für die Initiierung von Immunreaktionen im ZNS. Auch in Abwesenheit anderer inflammatorischer Stimuli reicht der Einfluss von GM-CSF aus, um die Anwesenheit myeloider Zellen im ZNS zu induzieren. Darüber hinaus sind diese ZNS-DC in der Lage, Antigen zu präsentieren und als vollwertige APC zu fungieren.

## 2.2 Einfluss von intrazerebralem GM-CSF auf Mikroglia

Vorarbeiten hatten gezeigt, dass GM-CSF auf neonatale (Fischer und Bielinsky, 1999) und adulte (Aloisi et al., 2000; Fischer und Reichmann, 2001) Mikroglia zumindest *in vitro* starken Einfluss haben kann, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Neonatale Mikroglia differenzieren in Anwesenheit von GM-CSF zumindest in BALB/c Mausstamm in Richtung kompetenter DC.

Die i.c.v. GM-CSF Applikation zeigt jedoch erstaunlicherweise, dass GM-CSF *in vivo* zumindest bei einer relativ kurzen Applikationsdauer von sechs Tagen nur einen unwesentlichen Effekt auf hirnresidenten Mikroglia hat, der durch die massive Rekrutierung peripherer Zellen überdeckt wird. Im Gegensatz zu der sehr deutlichen Reaktion von DC mit abgerundeter Morphologie und einer starken CD45 Expression – zwei Merkmale, die für einen peripheren Ursprung dieser DC sprechen – ist der Einfluss von GM-CSF auf Mikroglia *in vivo* nicht dominant.

Dies lässt sich zum einen in der durchflusszytometrischen Analyse zeigen. Die Zahl der CD45<sup>low</sup> Mikroglia ist durch die i.c.v. Behandlung mit GM-CSF im Vergleich zu den drei Kontrollgruppen nicht signifikant erhöht. Innerhalb der CD45<sup>low</sup> ICL - d.h. der Mikroglia – ist ebenfalls keine CD11c-Expression detektierbar. Zusätzlich ist die Expression kostimulatorischer Moleküle auf CD45<sup>low</sup> Mikroglia nicht nachweislich induziert. Auch die Zahl der MHCII<sup>+</sup> ICL ist innerhalb der infiltrierenden CD45<sup>high</sup> Zellen wesentlich höher als auf Mikroglia, lediglich ein geringer Prozentsatz der CD45<sup>low</sup> ICL zeigte eine sehr starke Induktion der MHCII Expression auf der Zelloberfläche.

Der wesentlich größere Einfluss von GM-CSF auf Zellen peripheren Ursprungs wird auch in der Immunhistologie deutlich. Nach GM-CSF Behandlung zeigt sich eine Zunahme CD11b<sup>+</sup> ICL lediglich bei Zellen mit abgerundeter Morphologie. Auch der DC spezifische Marker CD11c lässt sich an Hirnschnitten GM-CSF behandelte Tiere nicht auf weitverzweigten Zellen in der weißen Substanz nachweisen. In Korrelation damit lässt sich auch MHCII nicht auf Mikroglia nachweisen. Da sowohl im ischämischen ZNS und auch bei *Toxoplasma*-Enzephalitis CD11c<sup>+</sup>

Mikroglia immunohistochemisch nachweisbar waren (Fischer et al., 2000; Reichmann et al., 2002), ist davon auszugehen, dass der GM-CSF Stimulus *in vivo* alleine nicht ausreichend ist für die vollständige Differenzierung der Mikroglia zu DC.

Gegen den Einfluss von GM-CSF auf Mikroglia *in vivo* spricht auch die Lokalisation der abgerundeten CD11c<sup>+</sup> und MHCII<sup>+</sup> Zellen: sie sind nach GM-CSF Behandlung nahe am Stichkanal und in den perivaskulären Infiltraten zu finden. Zusätzlich waren auch die Ki-67<sup>+</sup>, proliferierenden Zellen um diese Regionen lokalisiert. Sowohl die Lokalisation der Zellen in der Nähe der Gefäße und damit in unmittelbarer Nähe zur Peripherie als auch ihre abgerundete Morphologie und die hohe CD45 Expression weisen darauf hin, dass GM-CSF die Rekrutierung von myeloiden DC oder ihren Vorläufern aus der Peripherie bewirkt.

Dennoch kann mit diesen Experimenten nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Mikroglia auf GM-CSF reagiert, indem sie ihre Morphologie verändern und/oder die Expression von CD45 hochregulieren. Mikroglia lassen sich nur über die Expressionsstärke von CD45 und ihre ausgestreckte Morphologie von peripheren myeloiden Zellen unterscheiden. Aufgrund ihres gemeinsamen Ursprungs weisen sie keinerlei exklusive Marker auf, die eine Unterscheidung möglich machen könnten. Allerdings zeigen Mikroglia eine wesentlich geringere Proliferations- und Austauschrate als myeloide Zellen in der Peripherie.

Dies könnte durch die Generierung von Knochenmarkschimären zu Nutze machen, in denen sich myeloide Zellen und Mikroglia aufgrund allelischer Marker unterscheiden. Knochenmarkschimäre Mäuse werden generiert, indem Mäuse einer subletalen Strahlendosis exponiert werden. Das führt zur Zerstörung aller sich teilender Zellen und damit des hämatopoetischen Systems. Damit enthält die Peripherie keine Leukozyten und damit auch keine myeloiden Zellen mehr. Rekonstituiert man diese bestrahlten Mäuse dann mit Knochenmark aus einem anderen Mausstamm, so entsteht eine sogenannte Knochenmarkschimäre. Alle geweberesidenten Zellen und damit auch die Mikroglia im ZNS stammen vom Wirtsmausstamm ab; die hämatopoetischen Zellen in der Peripherie vom Donorstamm. Als Unterscheidungsmerkmal bieten sich hierbei die unterschiedlichen Allele von CD45 an. Normalerweise tragen die C57BL/6 Mäuse das CD45.2 Allel. Allerdings sind auch kongene CD45.1 C57BL/6 Mäuse erhältlich. Bestrahlt man CD45.2 Mäuse und rekonstituiert sie mit CD45.1 Knochenmark, so sind myeloide Zellen der Peripherie CD45.1<sup>+</sup>, während hirnresidente Mikroglia CD45.2<sup>+</sup> sind. Damit können die Zellpopulationen leicht mit spezifischen Antikörpern in der Durchflusszytometrie und in der Immunhistochemie unterschieden werden. Behandelte man

solche chimären Mäuse i.c.v. mit GM-CSF, so lässt sich definitiv sagen, welchen Ursprung die im ZNS auftretenden CD11c<sup>+</sup> Zellen haben. Der letztendliche Beweis, ob nach GM-CSF Behandlung Mikroglia transdifferenzieren oder myeloide (Vorläufer-) Zellen aus der Peripherie rekrutiert werden, könnte durch die Verwendung von Knochenmarkschimären gebracht werden.

Für die auffälligen Unterschiede in der Relevanz von GM-CSF *in vitro* und *in vivo* bei der Differenzierung von Mikroglia sind mehrere Erklärungen zu diskutieren. Die Ausdifferenzierung neonataler Mikroglia ist ein langsamer Prozess, der zunächst die Proliferation der Mikroglia in der Gesamtkulturskultur in Anwesenheit von GM-CSF vorsieht und anschließend eine zusätzliche Differenzierung ohne die Anwesenheit der M-CSF produzierenden Astrozyten in Sekundärkultur benötigt. Auch ohne die abschließende Sekundärkultur sind diese Mikroglia CD11c<sup>+</sup>, allerdings ist diese Expression nicht so hoch und die Zellen sind weniger responsiv gegenüber Stimulation mit IFN $\gamma$  oder LPS (Daten nicht gezeigt). Es ist daher also denkbar, dass *in vivo* das von den Astrozyten gebildete M-CSF die schnelle Aktivierung bzw. die Differenzierung der Mikroglia verhindert. Inwieweit dieses Szenario zutrifft, könnte zum Beispiel in M-CSF-defizienten Mäusen untersucht werden. Appliziert man diesen Tieren i.c.v. GM-CSF, könnte getestet werden, ob eine stärkere Mikrogliareaktion stattfindet. Außerdem war die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Wirkungsdauer von GM-CSF *in vivo* durch die längstmögliche Pumpenarbeitszeit von sieben Tagen begrenzt. Die Kultur neonataler Mikroglia sieht eine wesentlich längere GM-CSF Behandlung vor. Hier werden die Mikroglia ein bis zwei Wochen in der Gliakultur mit GM-CSF behandelt und anschließend für ca. zehn Tage in Abwesenheit von Astrozyten weiterkultiviert. Weitere Experimente mit alternativen Applikationsmethoden von GM-CSF, die eine längere Wirkungsdauer ermöglichen, müssten zeigen, inwieweit dann möglicherweise auch *in vivo* ein stärkerer Einfluss von GM-CSF auf Mikroglia zu beobachten ist.

Um die GM-CSF Wirkzeit zu verlängern, könnte man GM-CSF im ZNS unter der Kontrolle eines ZNS-spezifischen Promotors exprimieren. Bisher wurde für Mikroglia noch kein spezifischer Promotor beschrieben, der die alleinige Expression im ZNS zulassen würde. Dies ist bedingt durch ihren myeloiden Ursprung, sie teilen die transkriptionellen Eigenschaften mit myeloiden Zellen in der Peripherie. Zur spezifischen Expression im ZNS ist jedoch die Promotorregion des Gliafibrillären-aziden Proteins (GFAP) geeignet. GFAP wird im ZNS konstitutiv von Astrozyten gebildet und die ZNS-spezifische Expression von Proteinen durch den GFAP-Promotor ist bei verschiedenen inflammatorischen Zytokinen etabliert (Campbell et al., 1998b). Dazu könnte das GM-CSF Gen über spezifische Schnittstellen in einen GFAP-Promotor enthaltenden Vektor

kloniert werden. Mit Hilfe dieses Vektors könnten dann transgene Mäuse generiert werden. Mittels dieser transgenen Technik würde das Gen zusätzlich zum kompletten Genom eingebracht. Dabei findet die Integration zufällig und damit ungerichtet im Genom statt. Der Vergleich transgener Mauslinien kann dabei sehr unterschiedliche Expressionsstärken des Zielgens zeigen. Man kann dabei nicht ausschließen, dass das Gen mehrfach in das Genom integriert wurde. Zusätzlich ist die Zugänglichkeit des Promotors und damit seine Expressionsstärke abhängig vom Ort der Integration. Allerdings ist die GM-CSF Quantifizierung mittels ELISA-Technik bereits etabliert, und könnte so leicht bestimmt werden. Für die Expression von Zytokinen unter der Kontrolle eines GFAP-Promotors sind in der Literatur viele Beispiele bekannt. Sowohl die Funktion von IL-1 und IL-6 als auch von TNF wurden im ZNS bereits auf diese Weise untersucht (Campbell et al., 1998b). Die Expression keines dieser proinflammatorischen Zytokine führte zu einem embryonal letalen Phänotyp, und so ist auch die Prognose für GM-CSF vielversprechend. Mit Hilfe transgener Mäuse könnte dann auch die langfristige Wirkung von GM-CSF im ZNS untersucht werden. Damit sind Veränderungen in den Zellpopulationen und die phänotypische Zusammensetzung der ICL zu untersuchen.

Eine interessante Frage dabei ist, ob die Mikroglia nach längerer GM-CSF Anwesenheit im Gehirn - wie auch die in dieser Arbeit beschriebenen myeloiden Zellen - die Expression von CD11c induzieren und damit phänotypisch myeloiden DC ähneln. Im Folgenden könnte so geklärt werden, ob sie auch funktionell DC ähneln. Eine weitere wichtige Frage wäre, ob die ZNS spezifische Expression von GM-CSF ausreicht, um den Verlauf von inflammatorischen Prozessen wie EAE oder TE zu beeinflussen. Untersuchungen zur systemischen Applikation von GM-CSF deuten darauf hin, dass GM-CSF die inflammatorische Immunantwort fördert (Wang et al., 2000; Biondo et al., 2001; Miller et al., 2002). Inwieweit sich das auch im ZNS bestätigen lässt, wenn GM-CSF über einen länger als sieben Tage andauernden Zeitraum spezifisch im Gehirn überexprimiert wird, wäre mit dem Einsatz transgener Techniken zu klären.

Durch das Sortieren von GM-CSF behandelte Mikroglia *in vivo* über die Unterscheidung von CD45<sup>low</sup> vs. CD45<sup>high</sup> ICL könnte getestet werden, ob Mikroglia *ex vivo* die Fähigkeit der T-Zellstimulation haben. Vorangegangene Untersuchungen in dieser Arbeit *in vitro* hatten gezeigt, dass sich mausstammspezifisch deutliche Unterschiede in der stimulatorischen Aktivität der Mikroglia ergeben. Der Einfluss von GM-CSF *in vivo* wurde in C57BL/6 Mäusen untersucht. Es ist

möglich, dass die i.c.v. Gabe von GM-CSF in anderen Mausstämmen wie BALB/c aufgrund des genetischen Hintergrunds einen Effekt auf Mikroglia hat.

### **2.3 Vergleich der i.c.v. Applikation von GM-CSF und IFN $\gamma$**

Im Gegensatz zu der i.c.v. GM-CSF Gabe induziert die kontinuierliche Infusion von IFN $\gamma$  in den Hirnventrikel eine deutliche Induktion der MHCII Expression auf den weitverzweigten Zellen mit einer geringen CD45 Expression auf der Zelloberfläche. Diese Beobachtung bestätigt frühere Untersuchungen in Ratten, in denen die i.c.v. IFN $\gamma$  Gabe ebenfalls eine deutlichen Expression der MHCII auf Mikroglia induzierte (Jander et al., 2000).

Der Vergleich der Auswirkungen der i.c.v. Behandlung der beiden inflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$  und GM-CSF machte deutlich, dass die in dieser Arbeit gezeigten Effekte von GM-CSF kein generelles Resultat inflammatorischer Zytokine auf das ZNS sind. In IFN $\gamma$  behandelten Mäusen ist eine vergleichbare Zunahme der ICL wie in den PBS behandelten Kontrolltieren zu beobachten. GM-CSF induziert einen starken Anstieg myeloider Zellen im ZNS, hat jedoch vergleichbar mit der IFN $\gamma$  Applikation kaum einen Einfluss auf die Anzahl der T-Zellen und B-Zellen. Dies weist darauf hin, dass durch die i.c.v. Applikation von GM-CSF generell die Integrität der BHS nicht zerstört wurde.

### **2.4 Rekrutierung von Zellpopulation in das ZNS**

Die abgerundete Morphologie der infiltrierenden Zellen und ihre hohe CD45 Expression weisen darauf hin, dass GM-CSF eine Infiltration in das ZNS induziert. Dennoch ist nicht klar, in welchem Reifezustand die Zellen einwandern. GM-CSF kann die BHS passieren (McLay et al., 1997), es ist also möglich, dass es aus der Peripherie DC mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Phänotyp anlockt. Denkbar ist auch, dass myeloide Vorläuferzellen in das ZNS migrieren. Durch die immunhistologischen Untersuchung mit dem Proliferationsmarker Ki67 wird deutlich, dass die Zellen im ZNS nach GM-CSF Gabe zumindest in einem gewissen Maß proliferieren. Dabei sind die Ki67<sup>+</sup> Zellen besonders in direkter Nähe zum Stichkanal lokalisiert. In dieser Region ist die Zahl der morphologisch weitverzweigten Mikroglia gering, und die Zellen zeigen nach Färbung von CD11c und MHCII eine abgerundete Morphologie. Unabhängig davon, wie viele

Zellen in das ZNS rekrutiert werden, konnte in dieser Region auch die Teilung von Zellen beobachtet werden.

Zukünftig sollte geprüft werden, wie die im ZNS vorzufindenden myeloiden Zellen die BHS überwinden. Dazu sollten wichtige Adhäsionsmoleküle angefärbt werden, die zur Migration durch die BHS wichtig sind. Für die Adhäsionsmoleküle VCAM und ICAM-1 konnte gezeigt werden, dass sie in vielen inflammatorischen Prozessen auf den Endothelzellen der BHS exprimiert werden (Zameer und Hoffman, 2003). Zusätzlich wurde kürzlich ein weiteres Adhäsionsmolekül – das sogenannte ALCAM - entdeckt, welches gerade bei der Migration in das ZNS eine wichtige Rolle spielt. Die Expression von ALCAM ist in der chronischen Phase der EAE erhöht, während die Blockierung von ALCAM die Zahl der eingewanderten Zellen deutlich reduziert (Cayrol et al., 2008). Inwieweit GM-CSF die Expression dieser Adhäsionsmoleküle beeinflusst, und so die Rekrutierung von myeloiden Zellen in das ZNS bewirkt, sollte in Zukunft geklärt werden.

### 3 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein eindeutiger Beitrag zum Verständnis der Funktion von GM-CSF bei der Differenzierung von myeloiden DC im ZNS geliefert. Obwohl GM-CSF auf Mikroglia *in vitro* wirkt - indem die Ausdifferenzierung von DC phänotypisch in nahezu allen untersuchten Mausstämmen vergleichbar induzierte - zeigten diese GM-CSF differenzierten Mikroglia große Unterschiede im Bezug auf die Kapazität einer T-Zellstimulation und -inhibition. Der Mechanismus der Hemmung der T-Zellaktivierung im C57BL/6 Hintergrund konnte nicht auf bisher beschriebene Signalwege zurückgeführt werden, deshalb müssten zukünftig weitgreifende Untersuchungen angestrebt werden. Eine gute Strategie hierbei wäre die Mikroarrayanalyse. Der Vergleich von Mikroglia mit T-Zell-stimulatorischen und T-Zell-inhibitorischen Potential wird zeigen, welche Gene differenziell exprimiert werden und damit eventuell für die hemmende Eigenschaft verantwortlich sind. Sollten sich dabei Kandidatengene finden, die für die Vermittlung der Hemmung denkbar sind, so wird es eine interessante Aufgabe sein, diese weiter zu charakterisieren. Dabei sollte getestet werden, ob durch die Blockade eines möglichen Zielgens der T-Zell-inhibitorische Phänotyp wieder aufgehoben werden kann.

Bei der alleinigen Gabe von GM-CSF ins ZNS *in vivo* konnte gezeigt werden, dass auch in C57BL/6 Mäusen ohne weitere inflammatorische Stimuli myeloide DC induziert werden, die T-Zell-stimulatorisch wirken. Damit ist gezeigt, dass GM-CSF alleine eine inflammatorische Umgebung im immunprivilegierten ZNS induzieren kann. Erstaunlicherweise ließ sich kein deutlicher Effekt auf hirnresidente Mikroglia nachweisen, die im Gehirn vorhandenen DC sind aufgrund ihrer Morphologie und der Stärke der CD45 Expression höchstwahrscheinlich als periphere ins ZNS rekrutierte Zellen zu identifizieren. Da sowohl die Änderung der Zellmorphologie nach GM-CSF Gabe als auch die Expressionsverstärkung von CD45 nicht ausgeschlossen werden kann, sollten zukünftig knochenmarkschimäre Mäuse generiert werden. In diesen sind dann hirnresidente von peripheren Zellen eindeutig unterscheidbar. Damit wird der Ursprung der myeloiden Zellen im Gehirn nach intrazerebraler GM-CSF Gabe eindeutig nachvollziehbar sein.

Welche Rolle GM-CSF bei der Rekrutierung peripherer Zellen spielt, soll durch die *in vivo* Analyse des Expressionsverhaltens von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen auf Endothelzellen der BHS in Anwesenheit und Abwesenheit von GM-CSF überprüft werden. Eine weitere wichtige Aufgabe wird die Verlängerung der GM-CSF Applikation im ZNS sein, damit der Einfluss von

GM-CSF auch längerfristig untersucht werden kann. Deshalb sollten sich die unmittelbaren zukünftigen Arbeiten darauf konzentrieren, transgene Mauslinien zu erstellen, die GM-CSF unter einem ZNS-spezifischen Promotor exprimieren. In diesen Mauslinien könnte der Verlauf von Krankheitsmodellen wie EAE oder Infektion mit *T.gondii* unter Einwirkung von GM-CSF spezifisch im ZNS untersucht werden.

## IV Zusammenfassung

GM-CSF ist sowohl ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor als auch ein proinflammatorisches Zytokin. Während GM-CSF im gesunden ZNS fehlt, ist es unter diversen pathologischen Bedingungen wie MS, Alzheimer und ZNS-Infektionen nachzuweisen und korreliert mit der Anwesenheit von DC im ZNS. Allerdings ist bisher nicht geklärt, welche Rolle GM-CSF bei der Initiierung einer Immunantwort im Gehirn zukommt.

GM-CSF hat *in vitro* einen wesentlichen Einfluss auf Mikroglia. In der Anwesenheit von GM-CSF differenzieren neonatale Mikroglia zu DC. In der vorliegenden Arbeit wurden diese GM-CSF differenzierte Mikroglia aus verschiedenen Mausstämmen näher charakterisiert und verglichen. Neben phänotypischen Eigenschaften von DC zeigten GM-CSF differenzierte Mikroglia aus BALB/c Mäusen zusätzlich das Hauptmerkmal reifer DC: sie hatten die Fähigkeit naive, allogene T-Zellen zu stimulieren. Im Gegensatz dazu war Mikroglia aus C57BL/6 Mäusen zwar phänotypisch identisch, aber nicht in der Lage, naive T-Zellen oder auch voraktivierte T-Zellen zu stimulieren. Interessanterweise inhibierten C57BL/6 Mikroglia in der Kokultur die T-Zellproliferation, die durch verschiedene APC-Populationen induziert wurde. Die inhibitorische Aktivität der GM-CSF differenzierten C57BL/6 Mikroglia war dabei unabhängig von deren Reifungsstatus, benötigte aber einen direkten Zell-Zellkontakt. Des Weiteren wurde die Genexpression putativer inhibitorischer Moleküle (wie inhibitorische Rezeptoren und Apoptose induzierende Rezeptoren) mittels Real-Time RT-PCR in BALB/c und C57BL/6 Mikroglia verglichen. Keines der untersuchten Gene war differenziell exprimiert und es ist daher unwahrscheinlich, dass diese bei der unterschiedlichen T-Zellaktivierung eine Rolle spielen. Die Analyse der stimulatorischen Eigenschaften von GM-CSF differenzierter Mikroglia wurde ausgeweitet um vier weitere Mausstämme. Interessanterweise stellte sich heraus, dass die stimulatorische Kapazität nur in BALB/c Mikroglia zu beobachten ist, während Mikroglia anderer Mausstämme unterschiedliche inhibitorische Kapazität aufwiesen.

Um die *in vivo* Rolle von GM-CSF bei der Induktion von DC im ZNS und deren funktionellen Aktivität zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse intrazerebroventrikulär mit GM-CSF behandelt. Diese Behandlung induzierte einen deutlichen und signifikanten Anstieg der intrazerebralen Leukozyten, die eine hohe Expression von CD45 aufwiesen. Diese hohe CD45

Expression spricht eher für einen peripheren Ursprung. Die infiltrierenden Zellen waren zum überwiegenden Teil myeloide DC (CD45<sup>high</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) und zeigten einen aktivierten Phänotyp (MHCII<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>). Zudem waren ZNS-DC aus GM-CSF behandelten C57BL/6 Mäusen fähig, naive T-Zellen in einer allogenen Reaktion zu stimulieren. Die alleinige intrazerebrale Gabe von GM-CSF *in vivo* reichte also - auch ohne weitere inflammatorische Stimuli - aus, funktionell aktivierte ZNS-DC zu induzieren. Im Gegensatz zu GM-CSF resultierte die intrazerebroventrikuläre Gabe von IFN $\gamma$  in einer erhöhten Expression von MHCII auf weitverzweigten Zellen, die residenten Mikroglia entsprechen, hatte jedoch keinen vergleichbaren Einfluss auf die Infiltration peripherer Zellen. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit für GM-CSF *in vivo* eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von DC im ZNS definiert werden. Bemerkenswert ist dabei, dass der GM-CSF Effekt *in vivo* primär über die Rekrutierung von DC oder deren Vorläufer aus der Peripherie vermittelt wird, während kaum eine Aktivierung hirnresidenter Mikroglia nachweisbar war.

## Summary

GM-CSF is a hematopoietic growth factor as well as a proinflammatory cytokine. While GM-CSF is lacking in normal brain tissue, it is expressed under various pathological conditions (such as MS, Alzheimer's disease and CNS-infections) and correlates with the presence of DC. However, the role of GM-CSF for the onset of the immune response in the brain is still unclear.

GM-CSF has profound effects on microglial cells *in vitro*. GM-CSF promotes the differentiation of neonatal microglia into cells similar to DC. In this dissertation these GM-CSF-differentiated microglia were further analysed and compared from different strains of mice. When generated from BALB/c mice GM-CSF-differentiated microglia were phenotypically similar to DC and exhibited the hallmark function of DC, namely the ability to stimulate naïve T lymphocytes in a mixed leukocyte reaction. In contrast, phenotypically comparable microglia from C57BL/6 mice were unable to activate allogeneic T cells and also primed T cells. Moreover, in co-cultures GM-CSF-differentiated microglia from C57BL/6 mice inhibited T-cell stimulation induced by different APC populations. This inhibitory activity of C57BL/6 microglia was independent of their maturation status and was cell-cell contact dependent. The analysis was extended by characterization of microglia from four additional mouse strains. The microglia of the four mouse strains exhibited differing inhibitory phenotypes, while the stimulatory phenotype was observed only in BALB/c microglia. To elucidate these striking strain-specific differences in T-cell activation and inhibition, gene expression of putative inhibitory molecules (inhibitory receptors and apoptosis-inducing genes) was compared in stimulatory BALB/c vs. inhibitory C57BL/6 microglia using real-time RT-PCR. None of these genes were differentially expressed and were therefore not responsible for mediating the differences in the T-cell activation.

To analyze the *in vivo* role of GM-CSF in the induction of DC and their functional activity as immune cells in the CNS, chronic intracerebroventricular administration of GM-CSF into the brains of healthy adult C57BL/6 mice were performed. This GM-CSF treatment significantly increased the number of leukocytes expressing high levels of CD45, indicative of peripheral, blood derived cells. The infiltrating cells were mostly DC of the myeloid lineage (CD45<sup>high</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) with an activated phenotype (MHCII<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>). Moreover, DC from GM-CSF treated mice were fully competent to activate naïve allogeneic T cells in a mixed leukocyte reaction. The

intracerebroventricular GM-CSF treatment induced the presence of functionally competent DC with an activated phenotype - even without a further inflammatory stimulus. In contrast, intracerebroventricular IFN $\gamma$  administration induced the MHCII expression on ramified cells resembling resident microglia but did not induce a comparable infiltration of peripheral cells. This dissertation revealed a crucial role for GM-CSF *in vivo* regarding the development of DC in the CNS. Notably the main effect of intracerebroventricular GM-CSF is the recruitment of DC (or their precursors) from the periphery, while almost no activation of brain resident microglia was observed.

## V Material und Methoden

### 1 Bezugsquellennachweis

Alle Chemikalien wurden in pro Analysis-Qualität bezogen. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines Wasser aus der MilliQ-Anlage (Millipore, Schwalbach) verwendet, nachfolgend als Aqua dest. bezeichnet.

#### 1.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol (50 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
n-Butanol	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol 97%	Merck, Darmstadt
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ficoll	GE Healthcare, München
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Glyzin	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Guanidinium-Isothiocyanat (GSCN)	Sigma, Taufkirchen
N-Laurylsarkosin	Sigma, Taufkirchen

Ketamin (10%)	WDT, Garbsen
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, Taufkirchen
2-Methylbutan	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (0,9%)	B.Braun, Melsungen
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Parafinöl	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Percoll	Invitrogen, Karlsruhe
PPD (Tuberkulin)	AsureQuality, Auckland, NZ
Propidiumiodid (PI)	Invitrogen, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Pierce, Rockford, USA
Tissue-Tek®, O.C.T Compound	Sakura, Zoeterwoude, NL
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Tween-20	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)	Biochrom, Berlin
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Tuberculin (PPD)	Behringwerke, Marburg
Xylazin (Rompun® 2%)	WDT, Garbsen
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

## 1.2 Geräte und Materialien

Alle für diese Arbeit verwendeten Plastikartikel wie Röhrchen oder Mikrotiterplatten stammen soweit nicht anders angegeben von Corning (Acton, USA), Nunc (Wiesbaden), Greiner (Frickenhäusen) oder BD Biosciences (Heidelberg).

Advantage™ RT-for-PCR Kit	BD Biosciences, Heidelberg
AxioCam HRC (Kamera)	Zeiss, Göttingen
Axioplan 2 (Mikroskop)	Zeiss, Göttingen
Basic 96 Harvester (Zellerntegerät)	Zinser Analytic Skatron, Frankfurt
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford, USA
Bestrahlungsgerät (IBL 437 C)	Oris Industrie, Ontario, CDN
BetaPlate Scint (Szintillationsflüssigkeit)	LKB Wallac, FIN
BioDocAnalyzer (Geldokumentation)	Biometra, Göttingen
Brain infusion Kit 3	Alzet, Cuprino, USA
Brutschrank (Heraeus B5060 EK/CO2)	Heraeus, Hanau
CM 3050 (Cryostat)	Leica, Wetzlar
DNA/RNA Calculator II	GE Healthcare, München
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Röhrchen (75 mm x 12 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Glasfaserfilter (Preprint Filtermat)	LKB Wallac, FIN
iCycler IQ5 (Realtime PCR Maschine)	Biorad, München
MACS-Säulen und Magneten	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nylongaze (40µm)	Neolab, Heidelberg
Nylonwolle	Polysciences, Eppelheim
Optima L-60 mit SW41-Ti Rotor (Ultrazentrifuge)	Beckmann Coulter, Krefeld
Osmotische Minipumpe (1007D)	Alzet, Cuprino, USA
Px2 Thermo Hybaid (PCR Maschine)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Rotana 46 RC (Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen
Gelaire BSB 4A (Sterilbank)	Flow Laboratories, Meckenheim
Sterilfilter (0,2µm)	Milipore, Schwalbach
Tecan Rainbow (ELISA-Photometer)	Tecan, Crailsheim
Vectastain Elite Kit	Vector Lab, Burlingame, USA
Zellsieb 40µm o. 70µm	BD Biosciences, Heidelberg
1205 Betaplate (Szintillationszähler)	LKB Wallac, FIN



	2 % (v/v) FCS
	0,05 % (w/v) Natriumazid
	steril filtriert
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer):	89 mM Tris-HCl, pH 7
	89 mM Borsäure
	2,5 mM EDTA
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer):	89 mM Tris-HCl, pH 7
	2,5 mM EDTA
6x DNA-Probenpuffer:	30 % (v/v) Glycerin
	0,025 % (w/v) Bromphenolblau
	0,025 % (w/v) Xylenxyanol
	in TBE-Puffer

### 3 Proteine

#### 3.1 Antikörper

Die aufgeführten Antikörper (Ak) wurden, wenn nicht anders angegeben von der Firma BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

---

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Anwendung</b>
$\alpha$ B220	RA3/6B2	FACS
$\alpha$ CD3	145-2C11	FACS ; Immunhistologie ; Zelltest
$\alpha$ CD11b	M1/70	FACS ; Immunhistologie
$\alpha$ CD11c	HL3	FACS
$\alpha$ CD11c	N418	Immunhistologie

$\alpha$ CD32/CD16	2.4G2	Fc-Block
$\alpha$ CD40	3/23	FACS
$\alpha$ CD45	30-F11	FACS
$\alpha$ CD80	16-10A1	FACS
$\alpha$ CD86	GL1	FACS
$\alpha$ GM-CSF, purified	MP1-22E9	ELISA
$\alpha$ GM-CSF, biotinyliert	MP1-31G6	ELISA
$\alpha$ IL-2, purified	JES6-1A12	ELISA
$\alpha$ IL-2, biotinyliert	JES6-5H4	ELISA
$\alpha$ I-A/I-E (MHC II)	25-9-17	FACS ; Immunhistologie
$\alpha$ Ki-67	TEC-3	Dako, Eching ; Immunhistologie

### 3.2 Enzyme

Collagenase/Dispase	10 mg/ml in Aqua dest. (steril)	Roche, Mannheim
DNase I	10 mg/ml in Aqua dest. (steril)	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	5000 U/ml	GE Healthcare, Karlsruhe

### 3.3 Zytokine

Für die *in vivo* Untersuchungen in Mäusen wurden folgende Zytokine in Endotoxin freiem PBS gelöst verwendet:

murines IFN $\gamma$	2000 U/Tag in 12 $\mu$ l	PeptoTech, Rocky Hill, USA
murines GM-CSF	1 $\mu$ g/Tag in 12 $\mu$ l	Tebu-Bio, Offenbach

Das oben aufgeführte IFN $\gamma$  wurde ebenfalls in der Zellkultur zur Stimulation von Mikroglia und DC verwendet.

In der Zellkultur verwendetes GM-CSF stammt aus der Präparation von P3X63/O-GM-CSF Hybridomzellen (s. 6.5).

## 4 Nukleinsäuren, Primer und Nukleotide

### 4.1 Nukleinsäuren

1 kb PLUS DNA-Leiter

Peqlab, Erlangen

## 4.2 Primer

Die aufgeführten Primer wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert, als Lyophilisat zugesendet, in TE-Puffer rekonstituiert und mit einer Konzentration von 0,02 mM bei -20°C gelagert. Die Sonden sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert und Teil der murinen Universal ProbeLibrary der Firma Roche, Mannheim.

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')	Sonde
β-Actin fwd	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA	CTCTGGCT
β-Actin rev	CGC TCA GGA GGA GCA ATG	
CD200R1 fwd	AAG AAT CAA ACA ACA CAG AAC AAC A	CTCCTCTG
CD200R1 rev	CTG TAC AGA CAC TGT AGT GTT CAC TTG	
CD200R2 fwd	TGG AGC AAG AGT CTG ATG ACC	GGAGGCAG
CD200R2 rev	TCC TCC GTC TTT ATC TTT ATC TCC	
CD200R3 fwd	CCA TGG AAC AGA ATC GAG GT	CAGCATCC
CD200R3 rev	CAT AGA GAA TGC TCA GCA AGG A	
CD200R4 fwd	CAC TGT GAC TGT CAG GAG CAC	GGGAGCAG
CD200R4 rev	GGG GGT GGT CAT TGT ACC TT	
FasL fwd	ACC GGT GGT ATT TTC ATG G	TGGCTCTG
FasL rev	AGG CTT TGG TTG GTG AAC TC	
G3PDH fwd	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC	
G3PDH rev	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC	
IDO fwd	GGG CTT TGC TCT ACC ACA TC	TGGTGGAG
IDO rev	AAG GAC CCA GGG GCT GTA T	
IL10 fwd	ACT GCA CCC ACT TCC CAG T	CAGAGCCA
IL10 rev	TGT CCA GCT GGT CCT TGT GTT	
iNOS fwd	CTT TGC CAC GGA CGAGAC	AGG CAG AG
iNOS rev	TCA TTG TAC TCT GAG GGC TGA C	
PD-L1 fwd	CCA TCC TGT TGT TCC TCA TTG	TCCTCCTC
PD-L1 rev	TCC ACA TCT AGC ATT CTC ACT TG	

PD-L2 fwd	TGT GCT GCC TTT TCT GTG TC	AGGAGCTG
PD-L2 rev	GCA GCA TGG TCT GTG TCA AT	
TGF- $\beta$ fwd	TGG AGC AAC ATG TGG AAC TC	TTCCTGGC
TGF- $\beta$ rev	CAG CAG CCG GTT ACC AAG	
TRAIL fwd	GTC CAG CTG GCC TAC AGC	GAGGAGAG
TRAIL rev	GCT TGC AGT TCC CTT CTG AC	

### 4.3 Nukleotide

[methyl- <sup>3</sup> H]-Thymidindesoxyribose (TdR)	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	Peqlab, Erlangen
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP)	Peqlab, Erlangen
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP)	Peqlab, Erlangen
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP)	Peqlab, Erlangen

Aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP wurde eine dNTP Stocklösung (je 10  $\mu$ M/ml) hergestellt.

## 5 Tierversuche

### 5.1 Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Inzuchtmäuse wurden in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf unter SPF-Bedingungen (spezifiziert Pathogen frei) gezüchtet und gehalten.

Mausstamm	MHCI-Haplotyp	Abk.
C57BL/6	H-2b	BL6
BALB/c	H-2d	B/c
(C57BL/6 x BALB/c) F1	H-2bxd	F1
129/J	H-2b	129
C3H/HeJ	H-2k	C3H
FVB	H-2q	
NMRI	divers	

## 5.2 Präparation neonataler Hirnzellen

Einen Tag nach der Geburt wurden neugeborene Mäuse mittels CO<sub>2</sub>-gesättigter Atmosphäre schmerzfrei getötet und anschließend kurz in 70% Ethanol gewaschen und dekapitiert. Zur Entnahme des Gehirns wurden die Ohrenkanäle durchtrennt und die Kopfhaut und die Schädeldecke entfernt. Nach der Entfernung der Hirnhäute von den beiden Kortexhälften wurden bis zu sechs Kortexhälften in 2 ml DMEM-Medium mit Hilfe einer Pasteurpipette mechanisch zerkleinert. Durch eine ausgezogene Pasteurpipette wurde das Homogenat bis zu einer Einzelzellsuspension homogenisiert. Diese Zellsuspension wurde in einem Volumen von 10 ml durch ein 70 µm Zellsieb gegeben und anschließend bei 300 x g für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Hirnzell-Medium aufgenommen und gezählt.

## 5.3 Präparation von Knochenmark

Zur Gewinnung von Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen wurden 4 bis 6 Wochen alte Mäuse verwendet. Nach dem Töten der Mäuse in CO<sub>2</sub>-gesättigter Atmosphäre wurde das Fell vom Bauch und den hinteren Extremitäten entfernt. Die hinteren Extremitäten wurden distal vom Hüftgelenk abgetrennt und in eine mit 10 ml eiskaltem DMEM Medium gefüllte Petrischale (Ø 5 cm) überführt. Nachdem der Ober- und Unterschenkel vom Kniegelenk abgetrennt wurde, wurde das Knochenmark aus den Knochen mit einer 20 *gauge* Kanüle, die auf einer mit DMEM-Medium gefüllten 10 ml Einwegspritze steckte, in eine neue Petrischale ausgewaschen. Nach der Präparation aus beiden hinteren Extremitäten wurde das Knochenmark in ein 15 ml Spitzboden-Röhrchen überführt und mit einer 5 ml Plastikpipette mechanisch zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Anschließend wurde die Petrischale mit 5 ml DMEM-Medium nachgespült und die Zellen bei 4°C mit 300 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Um die Erythrozyten zu lysieren wurde das Zellpellet mit 2 ml 0,84% Ammoniumchlorid resuspendiert und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 ml DC-Medium gestoppt, zentrifugiert und gewaschen (10 min, 300 x g, 4°C). Das Pellet wurde in 5 ml DC-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

## 5.4 Präparation der Milz

Für die Präparation von Gesamtmilzzellen wurden 2-3 Monate alte Mäuse in CO<sub>2</sub>-gesättigter Atmosphäre getötet. Die Bauchhöhle der Mäuse wurde geöffnet, die Milz steril entnommen und in eiskaltes Zell-Medium überführt. In einer 50 mm Petrischale wurde durch Zerreiben der Milz zwischen zwei sterilen Mattrand-Objektträgern eine Zellsuspension hergestellt. Die groben Bindegewebsreste und Zellaggregate wurden auf Eis für 10 min sedimentiert. Die im Überstand enthaltenen Zellen wurden pelletiert (10 min, 300 x g, 4°C). Danach wurden die Erythrozyten durch Resuspendieren in 0,83 % NH<sub>4</sub>Cl (2 ml, 2 min, RT) depletiert. Die Zellen wurden noch einmal gewaschen, in Zell-Medium aufgenommen, gezählt und bis zur Verwendung auf Eis gestellt. Durchschnittlich wurden 1 x 10<sup>8</sup> Milzzellen aus Milzen nicht infizierter Mäuse isoliert. Vor der Verwendung als antigenpräsentierende Zellen (APC) wurden die Milzzellen mit einer Dosis von 10 Gy  $\gamma$ -bestrahlt, um ihre Eigenproliferation zu unterdrücken.

## 5.5 Präparation der Intrazerebralen Leukozyten

Intrazerebrale Leukozyten (ICL) wurden aus 4-6 Wochen alten Mäusen präpariert. Damit nur die ins Gehirn eingewanderten Leukozyten isoliert werden, müssen die Mäuse vor der Präparation des Gehirns perfundiert werden, um die Blutgefäße zu spülen.

Dazu wurden die Tiere mit einem Anästhetikum (10  $\mu$ l Anästhetikum/g Körpergewicht) i.p betäubt und der Brustkorb der Maus geöffnet. In die Vena carva unterhalb des Herzens wurde ein Schnitt gesetzt und zur Perfusion langsam 50 ml kaltes PBS in die linke Herzkammer gespritzt. Den Erfolg der Perfusion kann man anhand der Leberfärbung kontrollieren. Die dunkelrote Leber entfärbt sich im Lauf der Prozedur. Anschließend wurde die Maus dekapitiert, die Schädeldecke entfernt und das Gehirn steril entnommen.

Das Gehirn wurde mit einer Schere grob zerkleinert und in Hirnzell-Medium durch mehrfaches Aufziehen mit einer 18G Kanüle homogenisiert. Danach wurde das Gehirn mit 10 mg Collagenase/Dispase für 45 min bei 37°C inkubiert und nach Resuspendieren und Zugabe von 1 mg DNase I für weitere 45 min bei gleicher Temperatur inkubiert. Die Zellsuspension wurde einmal mit Hirnzell-Medium gewaschen (10 min, 300 x g, 4°C), grobe Gewebereste wurden über ein 70  $\mu$ m Zellsieb entfernt. Die pelletierten Hirnzellen (10 min, 300 x g, 4°C) wurden in 20 ml 70 % Percoll-Lösung (Amersham) aufgenommen und langsam mit gleichem Volumen 30 % Percoll-

Lösung überschichtet. Der Gradient wurde 25 min bei RT mit 1000 x g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befand sich myelinhaltiges Hirngewebe auf der Oberfläche des Gradienten, die Leukozyten in der Interphase. Die Myelinschicht wurde abgesaugt und die Leukozyten mit einer Transferpipette geerntet. Die ICL wurden zweimal mit Hirnzell-Medium gewaschen (10 min, 400 x g, 4°C; 10 min 300 x g, 4°C), das Pellet in Hirnzell-Medium aufgenommen und gezählt.

Anästhetikum:                    1,2 % Ketamin  
    0,2 % Xylazin  
    in 0,9 % NaCl

Percoll:                            100% Percoll = Percoll und 10fach PBS (9:1)  
    70% Percoll durch Verdünnung mit Hirnzell-Medium  
    30% Percoll durch Verdünnung mit PBS

## 5.6 Pumpenimplantation

Um die Wirkung von GM-CSF auf Zellen im Gehirn zu untersuchen, wurden Mäuse eine intrazerebrale Minipumpe implantiert. Diese Pumpen ermöglichen die Gabe des Zytokins über mehrere Tage direkt in den vorderen Ventrikel. Dabei wird eine osmotische Minipumpe unter die Rückenhaut der Maus geschoben, die mit einem ‚brain infusion kit‘ verbunden ist. Die Pumpe besteht aus einem Hohlraum umschlossen von einer osmotischen Substanz und einer starren, semipermeablen Außenhülle. Gewebeflüssigkeit lässt die Substanz aufquellen und erwirkt so einen kontinuierlichen Druck auf den inneren Hohlraum, in dem das Zytokin vorliegt. Das hier gewählte Modell 1007D ermöglicht die Gabe über sechs Tage mit einer Flussrate von 0,5µl pro Stunde. Über einen Schlauch ist diese Pumpe mit dem ‚brain infusion kit‘ verbunden, einer Kanüle in einer Halterung, die auf die Schädeldecke aufgesetzt und fixiert werden kann. Über die Kanüle wird dann der Inhalt der Pumpe in den vorderen Ventrikel gepumpt. Damit die Pumpe kontinuierlich arbeiten kann, musste sie für 24h mit dem Zytokin gefüllt bei Raumtemperatur in PBS vorinkubiert werden. Zur Implantation der Pumpe wurden Mäuse über das Inhalationsanästhetikum Isofluran betäubt und der Kopf fixiert. Anschließend wurde die Haut

über der Schädeldecke entfernt und trockengetupft. Über das Loch in der Schädelhaut wurde dann unter die Haut an Hals und Rücken eine Schere eingeführt, um die Haut abzulösen. Dort wurde die vorinkubierte Pumpe so platziert, dass das ‚brain infusion kit‘ über der Schädeldecke endete. Über eine stereotaktische Apparatur wurde die Einstichstelle mit den Koordinaten +1/+1/-2 nach dem Bregma-Index x/y/z markiert. Dann wurde ein Loch mit einem elektrischen Zahnarztbohrer in die Schädeldecke gebohrt und die Spitze des ‚brain infusion kit‘, eine 30G Kanüle durch das Loch geführt und die Halterung mit Zahnarztzement festgeklebt. Nach dem Antrocknen des Zements wurde die Haut darüber zugenäht. Zur Beendigung der Narkose wurde die Maus mit reinem O<sub>2</sub> beatmet und abschließend wurden die operierten Mäuse in Einzelkäfige gesetzt. Nach 4-7 Tagen wurden die ICL analysiert oder die Gehirne für Immunhistologie entnommen.

Die osmotischen Pumpen wurden für die in dieser Arbeit durchzuführenden Experimente entweder mit GM-CSF oder IFN- $\gamma$  gelöst in PBS gefüllt. Ausserdem wurden Kontrolltieren Pumpen implantiert, die nur mit der Endotoxin freien Trägerlösung PBS gefüllt waren.

## 6 Zellkultur

Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilwerkbank unter Verwendung steriler Materialien und Lösungen durchgeführt. Zur Sterilisation von Lösungen und Puffern wurden diese durch eine 0,2  $\mu$ m Membran sterilfiltriert. Glasgeräte wurden für 4 h bei 210°C hitzesterilisiert. Alle verwendeten Zellkulturmedien wurden mit 5 % bzw. 10 % FCS supplementiert, das zuvor für 30 min bei 56°C erhitzt wurde, um Komplementproteine zu inaktivieren. Zellzahlen wurden durch die klassische Methode in der Neubauerkammer ausgezählt, wobei tote Zellen durch Anfärben mit Trypanblau ausgeschlossen wurden.

### 6.1 Neonatale Gliakultur

Für die neonatale Gliakultur wurden  $0,6 \times 10^6$  Zellen pro 6-well in Hirnzell-Medium ausgesät. Nach Anwachsen der ersten adhärenen Zellen (nach ca. drei Tagen) wurde das Medium komplett

ausgetauscht, wodurch nicht-adhärenente Zellen entfernt wurden. Danach wurde alle drei Tage das Medium gewechselt. Nach acht bis zehn Tagen Kultur waren die Zellen konfluent.

Um Mikroglia zu erhalten wurde bei der konfluenten Kultur das komplette Medium abgesaugt und durch Mikroglia-Medium ersetzt. Nach drei Tagen wurden weitere 3 ml Medium dazugegeben und dann alle drei bis vier Tage die Hälfte des Mediums durch neues Mikroglia-Medium ersetzt. Die nicht-adhärenenten Mikrogliazellen wurden nach 14-21 Tagen geerntet und gezählt.

## **6.2 Sekundärkultur in GM-CSF**

Um die Mikrogliazellen ohne die Anwesenheit von Astrozyten zu kultivieren, wurden sie aus der GM-CSF stimulierten neonatalen Gliakultur geerntet und mit einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^6$  Zellen in 6-well Platten umgesetzt, die so beschichtet sind, dass sie kaum Zelladhäsion zulassen (ultra low attachment). In diesen Platten kann man die Mikroglia für 8-14 Tage kultivieren, wie vorher auch wird alle drei bis vier Tage ein Mediumwechsel mit Mikroglia-Medium durchgeführt. Für die Stimulation wurden die Zellen geerntet,  $1-2 \times 10^6$  Zellen pro 6-well ausgesät und mit LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) und/oder  $\text{IFN}\gamma$  ( $1000 \text{ U/ml}$ ) für 24h in Mikroglia-Medium stimuliert.

## **6.3 Knochenmarkskultur in GM-CSF**

Die Differenzierung der Knochenmarkszellen erfolgte wie beschrieben (Lutz et al., 1999). Durchschnittlich wurden  $40-60 \times 10^6$  Knochenmarkszellen pro Maus gewonnen. Je  $20 \times 10^6$  Zellen wurden in 10 ml DC-Medium ausgesät auf bakteriologische Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm) und nach drei Tagen 10 ml frisches Medium dazugegeben. Anschließend wurden alle zwei bis drei Tage die Hälfte des Mediums mit neuem DC-Medium supplementiert und die nicht adhärenenten DC nach 8-10 Tagen verwendet. Für die Stimulation wurden die Zellen an Tag 8-10 geerntet, mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen pro Schale ausgesät und mit LPS ( $1\mu\text{g/ml}$ ) und/oder  $\text{IFN}\gamma$  ( $1000\text{U/ml}$ ) für 24h in DC-Medium stimuliert.

## 6.4 T-Zellklone

Für diese Arbeit wurden die T-Zellklone LNC.2 (Schmitt et al., 1990) und 4Tx12 (Reichmann et al., 1997) verwendet. T-Zellklone müssen regelmäßig mit syngenen APC und dem spezifischen Antigen restimuliert werden. Der Klon LNC.2 stammt aus einer BALB/c Maus und erkennt H-2<sup>d</sup> restringiert PPD (Tuberkulin). Der Klon 4Tx12 stammt aus einer Kreuzung von C57BL/10 und C3H/HeJ, und erkennt ein Antigen aus dem Toxoplasma (TLA) H-2<sup>b</sup> restringiert, daher wurden APC aus C57BL/6 Mäusen verwendet. Für die Restimulation wurden  $2 \times 10^6$  T-Zellen in 24-well Platten mit  $1 \times 10^5$  syngenen APC und Antigen in der Konzentration  $10 \mu\text{g/ml}$  für 24h in Zellmedium stimuliert. Dann wurde die Hälfte des Mediums mit Zellmedium ersetzt, dem 2% IL-2 Überstand (s. 6.5) beigefügt waren. Die stark proliferierenden T-Zellen wurden so lange alle 2-3 Tage gesplittet, bis die Proliferation nachließ und die T-Zellen mit einer sukzessiv kleiner werdenden IL-2 Konzentration auf 1% überlebten. Damit konnten die nun ruhenden T-Zellen für 1-2 Wochen in antigenspezifische Proliferationsassays eingesetzt werden.

## 6.5 Herstellung von GM-CSF und IL-2 Überstand

Zur Herstellung von GM-CSF wurde die Zelllinie P3X63/O-GM-CSF benutzt. Diese Hybridomzellen sekretieren GM-CSF in den Überstand, der dann für die Stimulation von DC-Wachstum dem Medium zugesetzt werden kann. Zur Herstellung von IL-2 konditioniertem Medium wurden P3X63/O-IL-2 verwendet.

### 6.5.1 Kultivierung der P3X63/O-GM-CSF Zellen

Die Hybridomzelllinie wurde mit einer Konzentration von  $0,02 - 0,04 \times 10^6$  Zellen/ml in Zell-Medium in großen Zellkulturflaschen ausgesät und für sechs bis sieben Tage ohne Mediumwechsel inkubiert. Anschließend wurde der Überstand aus den Flaschen zweimal zentrifugiert, um die Zellreste zu entfernen (10 min, 4°C, 600 x g und 15 min, 4°C, 1000 x g). Der Überstand wurde anschließend sterilfiltriert, die Konzentration von GM-CSF oder IL-2 mittels

ELISA bestimmt, um den Überstand mit vorhergehenden Präparationen vergleichen zu können und der Überstand aliquotiert bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 6.5.2 ELISA

Die Quantifizierung der Zytokine erfolgte mittels ELISA. Der Nachweis erfolgt photometrisch mit Hilfe von monoklonalen anti-Zytokin Antikörpern und Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern nach enzymatischer Umsetzung eines Chromogens. Bei dem hier verwendeten ‚Sandwich-ELISA‘ wurde der Primärantikörper (‚purified‘) in einer Konzentration von  $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS an eine ELISA-Mikrotiterplatte (‚Maxi-Sorb‘, Nunc) bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht angelagert. Nach der Anlagerung erfolgte die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit der Blocklösung für mindestens eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Nach einer einstündigen Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit einem Zytokin-Standard und der titrierten Probe wurde die Platte fünfmal mit PBS gewaschen und danach mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (biotinyliert,  $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte eine Inkubation für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit Streptavidin-Peroxidase. Nach dem letzten Waschgang wurde durch Zugabe des Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) eine Farbentwicklung (blau) bei RT beobachtet. Diese Reaktion wurde bei beginnender Färbung des Leerwerts mit  $1\ \text{M}\ \text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt. Der Farbumschlag wurde über die Extinktion bei  $450\ \text{nm}$  im ELISA-Photometer bestimmt.

Blocklösung: 10% FCS in PBS

Waschlösung: 0,05% Tween-20 in PBS

## 6.6 Kultivierung von *T. gondii*

### 6.6.1 Kultivierung von Wirtszellen

Die murine Fibroblastenlinie L929 (Sanford et al., 1948) diente als Wirtszelle für *T. gondii* Tachyzoiten des Stammes BK. Je  $3 \times 10^6$  L929-Zellen wurden in Zell-Medium in

Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Grundfläche ausgesät. Die Zellernte erfolgte drei bis vier Tage später mit einem Zellschaber. Die geernteten Zellen wurden mit 300 x g 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert, in der Neubauer Zählkammer gezählt und wieder ausgesät.

### 6.6.2 *In vitro* Passage

Der hoch virulente *T. gondii* Stamm BK war ursprünglich aus dem Liquor eines erkrankten Kindes isoliert worden (Winsser und Verlinde, 1948). Er stammt aus dem Institut für Medizinische Parasitologie, Bonn. Dieser nur Tachyzoiten ausbildende Stamm wurde in L929-Fibroblaten kultiviert. Dafür wurden 3 x 10<sup>6</sup> L929-Zellen mit 3 x 10<sup>7</sup> Toxoplasmen infiziert. Zwei bis drei Tage später waren die Wirtszellen lysiert und die freien Toxoplasmen im Kulturüberstand konnten geerntet werden. Dazu wurden die extrazellulären Toxoplasmen ab gespült und die Wirtszellreste pelletiert (5 min, 120 x g, RT). Zur Sedimentation der Toxoplasmen wurde der Überstand erneut zentrifugiert (15 min, 600 x g, RT). Das Pellet wurde in Zell-Medium aufgenommen und gezählt. Für die erneute Infektion von Wirtszellen wurden je 3 x 10<sup>7</sup> Toxoplasmen auf frische L929-Zellen gegeben. Zur Präparation von TLA wurden die Toxoplasmen einmal mit PBS gewaschen (15 min, 600 x g, 4°C), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das Pellet bei -70°C gelagert.

### 6.6.3 *In vivo* Passage

Der schwach virulente (Schluter et al., 1991) stammt aus einem *Toxoplasma*-infizierten Schwein und wurde uns vom Institut für Medizinische Parasitologie, Bonn, zur Verfügung gestellt. Toxoplasmen des Stammes DX wurden in Toxoplasma-resistenten NMRI-Mäusen passagiert. Gehirnzysten wurden vier bis zwölf Wochen nach Infektion präpariert.

Dazu wurden mit *T. gondii*-Stamm DX chronisch infizierte Mäuse in CO<sub>2</sub>-gesättigter Atmosphäre getötet, das Gehirn steril entnommen, in PBS gewaschen und mit einer sterilen Schere grob zerkleinert. Nach Zugabe von PBS wurde das Gewebe durch Aufziehen mit sukzessiv kleiner werdenden Kanülen (18G, 20G, 22G) aufgeschlossen und anschließend sedimentiert (5 min, 4°C, 120 x g). Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, mit Ficoll unterschichtet und zentrifugiert (25 min, RT, 1000 x g, ohne Bremse). Der Überstand wurde abgenommen und die Zysten im Pellet

gezählt. Die Zysten wurden anschließend unter mikroskopischer Kontrolle mit Trypsin/EDTA lysiert. War der Großteil der Zysten aufgebrochen, wurde die Lyse durch Zugabe des gleichen Volumens FCS abgestoppt. Die nun frei vorliegenden Toxoplasmen wurden mit PBS gewaschen (15 min, 4°C, 650 x g) und in PBS aufgenommen. Es wurden durchschnittlich 600 Zysten aus einem Gehirn isoliert.

Zur Neuinfektion von Mäusen wurden 2-3 Monate alte Tiere verwendet, denen Bradyzoiten aus 3 lysierten Zysten in 200 µl PBS intraperitoneal (i.p.) gespritzt wurden. Zur Passage Zysten-bildender Toxoplasmen dienten NMRI-Mäuse. Für die in dieser Arbeit benötigten ICL aus Mäusen nach Toxoplasmainfektion wurden C57BL/6 Mäuse benutzt und die ICL nach 28 Tagen geprüf.

#### **6.6.4 Präparation von Toxoplasma-Lysat (TLA)**

Toxoplasmenpellets des Stammes BK wurden in sterilem Aqua dest. aufgenommen, und auf  $10^9$  Toxoplasmen/ml eingestellt. Die Suspension wurde in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Nach 10 Einfrier/Auftau-Zyklen wurden die Zellreste durch zweifache Zentrifugation (20 min, 800 x g, 4°C und 15 min, 10.000 x g, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die darin enthaltene Proteinmenge bestimmt.

Der zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzte BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) kombiniert die als Biuret-Reaktion bekannte Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> durch Proteine in alkalischer Lösung mit der colorimetrischen Detektion des Cu<sup>+</sup> durch die Umsetzung mit Bicinchoninsäure (BCA) (Smith et al., 1985). Die Bestimmung der TLA-Konzentration wurde nach dem „Microwell Plate Protocol“ des Herstellers durchgeführt. BSA wurde als Standard in Doppelwerten, die Probe in Dreifachwerten mit PBS verdünnt titriert. Nach Inkubation (30 min, 37°C) mit dem BCA-Reagenz wurde die Extinktion bei 562 nm im ELISA-Photometer gemessen. Die erhaltene Proteinmenge lag bei 1,7 mg/10<sup>9</sup> Toxoplasmen.

## 7 Immunbiologische Methoden

### 7.1 Proliferationsassays

Eine wichtige Eigenschaft reifer DC ist die Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren. Dies kann in T-Zellproliferationsassays getestet werden. Dabei werden T-Zellen mit APC zusammen in Kokultur genommen und überprüft, ob die T-Zellen die nötigen Signale von den DC erhalten, um zu proliferieren. Die Eigenproliferation der APC wird verhindert, indem die APC Population vorher mit 10 Gray bestrahlt wird. Die T-Zellproliferation wird gemessen, indem man den Zellen radioaktiv markiertes  $^3\text{H}$ -Thymidindesoxyribose ( $^3\text{H}$ -TdR) im Überschuss zur Verfügung stellt, das in die DNA der sich teilenden T-Zellen eingebaut wird. Zur Auswertung werden die Mikrotiterplatten aufgetaut und der Inhalt mit Hilfe eines Zellerntegeräts über einen Glasfilter abgesaugt, auf dem die radioaktiv markierte DNA haften blieb. Nach Trocknung wird der Filter mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in Plastikfolie eingeschweißt und die Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung im  $\beta$ -Counter (1205 Betaplate, Perkin Elmer, Rodgau) gemessen. Die Stärke der Radioaktivität, gemessen in "counts per minutes" (cpm) dient als Maß für die Stärke der T-Zellproliferation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Proliferationsansätze durchgeführt.

#### 7.1.1 MLR – „mixed leukocyte reaction“

Bei der MLR wird die Fähigkeit von APC getestet, naive T-Zellen zu stimulieren. Dabei stammen APC und T-Zellen aus verschiedenen Mausstämmen. Die T-Zellen erkennen die APC als „fremd“ und werden aktiviert, wenn die APC ausreichend kostimulatorische und MHC Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentiert. Für die in dieser Arbeit angewendeten MLRs wurden DC mittels MACS aus Milzen aufgereinigt, oder DC aus Knochenmarkskulturen eingesetzt. Pro well der A/2 (halbe Fläche) 96 well Mikrotiterplatten wurden  $2 \times 10^4$  DC in Triplikaten eingesetzt, mit 10 Gy bestrahlt, über 7 Verdünnungsschritte (1:2 verdünnt) titriert und mit  $10^5$  T-Zellen (s. 7.3) in Kokultur für 72h inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für weitere 24h in Anwesenheit von 7,4 kBq/well  $^3\text{H}$ -TdR inkubiert und anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

Für die Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von Mikroglia wurden als bestrahlte APC  $2,5 \times 10^3$  Knochenmarks-DC oder  $2 \times 10^4$  Milz-DC eingesetzt und mit  $10^5$  T-Zellen in Anwesenheit von unterschiedlich stimulierter Mikroglia (Anfangskonzentration  $2 \times 10^4$  Mikroglia/well in 7 Verdünnungsschritten einer 1:2 Verdünnung) kokultiviert.

### 7.1.2 Antigen-spezifische T-Zellproliferation

Zur Bestimmung der antigenabhängigen Aktivierung von T-Zellen wurden antigen-spezifische T-Zellklone mit APC und dem benötigten Antigen zusammen in Kultur gehalten. Dazu wurden in 96 well Mikrotiterplatten pro well  $2 \times 10^4$  T-Zellen und  $1 \times 10^5$  bestrahlte, syngene APC in Triplikaten mit Antigen in Zell-Medium ausgesät. Bei Testung von C57BL/6 Mikroglia diente als Antigen TLA in einer Konzentration von 0,1-100  $\mu\text{g/ml}$  und wurde mit dem T-Zellklon 4Tx12 getestet. Bei der Analyse von BALB/c Mikroglia wurden die T-Zellen des Klons LNC.2 mit PPD (Tuberkulin) in einer Konzentration von 0,3-30  $\mu\text{g/ml}$  stimuliert. Als Negativkontrolle dienten APC und T-Zellen ohne Antigen. Als Positivkontrolle wurden die T-Zellen mit einem  $\alpha\text{CD3}$ -Ak (BD Pharmingen) in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  aktiviert. Nach 48h Kultur wurde der Test mit je 7,4 kBq/well  $^3\text{H}$ -TdR für weitere 24h markiert und anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

Für die Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von Mikroglia wurden zur Stimulation  $1 \times 10^5$  APC mit  $2 \times 10^4$  T-Zellen inkubiert und die unterschiedlich stimulierten Mikroglia mit einer Anfangskonzentration von  $2 \times 10^4$  Mikroglia in 7 Verdünnungsschritten (1:2 Verdünnung) dazu titriert.

### 7.1.3 APC-unabhängige T-Zellproliferation

T-Zellen können auch durch eine direkte Aktivierung über den T-Zellrezeptorkomplex stimuliert werden. Mit dem Einsatz von  $\alpha\text{CD3}$ -Ak ist diese T-Zellstimulation APC und Antigen unabhängig. Zur besseren Kreuzvernetzung wurde  $\alpha\text{CD3}$ -Ak in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  über Nacht in PBS gelöst bei  $4^\circ\text{C}$  auf einer Mikrotiterplatte angelagert, mit Medium abgewaschen und  $2 \times 10^4$  T-Zellen für 72h inkubiert. Um zu testen, ob Mikroglia die APC-unabhängige T-Zellproliferation ebenfalls hemmen, wurden in Triplikaten mit 10 Gy bestrahlte Mikrogliazellen in Kokultur mit einer Anfangskonzentration von  $5 \times 10^3$  Zellen /well dazu titriert (5 Verdünnungsstufen; 1:2

titriert). In den letzten 24 h der Inkubationszeit wurde 7,4 kBq/well  $^3\text{H}$ -TdR zugegeben und anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

#### 7.1.4 Kokultur im Transwell

Um die Kontaktabhängigkeit der Mikrogliahemmung auf die T-Zellproliferation zu testen, wurde die Proliferation im Transwell getestet. Dazu wurden in der 24 well Mikrotiterplatte  $5 \times 10^4$  bestrahlte, allogene sDC mit  $10^6$  T-Zellen inkubiert. Im Transwell darüber mit einer Siebgröße von 5  $\mu\text{m}$  wurden in Duplikaten  $10^5$ ,  $5 \times 10^4$  oder  $2,5 \times 10^4$  Mikrogliazellen eingesetzt und für 72h inkubiert, anschließend mit 22,2 kBq/well  $^3\text{H}$ -TdR für weitere 24h inkubiert und eingefroren. Als Positivkontrolle wurden die Mikrogliazellen direkt zu den APC und den T-Zellen gegeben, das eingesetzte Transwell darüber war leer.

## 7.2 Aufreinigung über MACS

Für die Aufreinigung von DC aus der Milz und dem Gehirn wurde die Methode des 'Magnetic Cell Sorting' (MACS) verwendet. Hierzu werden kolloidale super-paramagnetische MicroBeads eingesetzt, die mit monoklonalen Ak gegen CD11c konjugiert sind (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach). Die Ak binden an CD11c<sup>+</sup> DC. Die paramagnetischen Zellen können anschließend über eine mit Eisenwolle gefüllte MACS-Säule in einem Magnetfeld von den negativen Zellen getrennt werden. Zur Elution wird die Säule aus dem Magneten genommen und die positive Zellfraktion mit MACS-Puffer von der Säule gespült.

Gesamtmilzzellen oder ICL wurden in 20 ml MACS-Puffer über ein 40  $\mu\text{m}$  Zellsieb (BD Falcon, Heidelberg) gegeben und gewaschen (10 min, 300 x g,  $4^\circ\text{C}$ ). Das Zellpellet wurde anschließend in 90  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer und 10  $\mu\text{l}$  MicroBeads pro  $10^7$  Zellen aufgenommen und 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem 20-fachen Volumen MACS-Puffer gewaschen und in MACS Puffer (500  $\mu\text{l}/10^8$  Zellen) auf eine LS-MACS-Säule (Miltenyi Biotech) im Magneten gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und der Durchfluss als negative Fraktion gesammelt. Nachdem die Säule aus dem Magneten entfernt wurde, wurde die positive Fraktion mit 5 ml MACS-Puffer von der Säule gespült. Die positiven und negativen Fraktionen wurden anschließend im Durchflusszytometer auf ihre Reinheit geprüft.

### 7.3 Aufreinigung über Nylonwolle

Für die Aufreinigung von T-Zellen kann man sich die Adhäsionseigenschaften der Zellpopulationen zu nutze machen. Inkubiert man Milzzellen mit Nylonwolle bei 37°C, so adhäreren alle Zellpopulationen sehr gut an der Nylonwolle, T-Zellen allerdings nicht. Sie kann man im anschließenden Elutionsschritt wieder von der Säule waschen. Für die Vorbereitungen wurde Nylonwolle in einer Spritze dicht gepackt und autoklaviert. Die Säule wurde so aufgebaut das auf die mit Nylonwolle gefüllte Spritze ein Drei-Wege-Hahn aufgesteckt wurde und auf den Auslauf eine 20G Kanüle aufgesteckt. Über das seitliche Ventil wurde 37°C warmen Zellmedium zum Äquilibrieren der Säule eingefüllt und für 45 min im Brutschrank vorinkubiert. Die aufzureinigende Milzzellsuspension wurde dann in warmem Zellmedium mit einer Zelldichte von  $75 \times 10^6/\text{ml}$  auf die Säule gegeben und die Säule mit dem gleichen Volumen warmen Zellmedium nachgespült. Anschließend wurde die Säule wieder für 45 min im Brutschrank inkubiert und die nicht gebundenen naiven T-Zellen über eine 23G Kanüle mit 20 ml warmem Zellmedium von der Säule gespült.

### 7.4 Durchflusszytometrie

Die Expression von Oberflächenantigenen wurde in Immunfluoreszenzanalysen mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellscanners (FACS) oder auch Durchflusszytometer genannt bestimmt. Dafür werden Oberflächenantigene mit Fluoreszenz-markierten Ak gefärbt, und die Fluoreszenz der Zellen im FACS detektiert. Als Fluoreszenzfarbstoffe sind an die Ak, Phycoerythrin oder Allophycocyanin konjugiert. Alternativ wurden biotinylierte Ak eingesetzt, die im zweiten Färbeschritt mit Streptavidin- Fluoresceinisothiocyanat oder Streptavidin-Allophycocyanin detektiert wurden. Da an ein Molekül Biotin mehrere Streptavidin-Moleküle binden, kann es dadurch zur Signalverstärkung kommen. Als Totfarbstoff wurde Propidiumiodid (PI) verwendet, welches von toten Zellen nicht mehr heraustransportiert werden kann, und mit der DNA interkaliert. Während der Messung werden die vorher gefärbten Zellen durch einen Flüssigkeitsstrom vereinzelt und an ein bzw. zwei Laserstrahlen vorbeigeführt, die die Fluorochrome an den Zellen anregen. Die emittierten distinkten Wellenlängen werden über verschiedene Photodetektoren aufgenommen. Zusätzlich wird das Forwärtstreulicht (FSC)

aufgenommen, welches eine Aussage über die Zellgröße zulässt und das Seitwärtsstreulicht (SSC), welches ein Maß für die Granularität der Zellen darstellt.

Zur Färbung der Zellen wurden  $1 \times 10^5$ –  $1 \times 10^6$  T-Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, über Nylongaze (40  $\mu\text{m}$ , Neolab) filtriert und in FACS-Röhrchen (Sarstedt) zentrifugiert (10 min, 300 x g, 4°C). Zur Verhinderung des “capping“ und der Internalisierung von Oberflächenmolekülen wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Um unspezifische Bindungen zu unterbinden, wurden die Zellen für 15 min mit Fc-Block in 25  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer inkubiert. Als Kontroll-Ak diente ein Ak mit gleichem Isotyp aber irrelevanter Spezifität.

Die Zellen wurden zunächst mit 0,5  $\mu\text{g}$  biotinyliertem Ak in 25  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer für 20-30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Im zweiten Färbeschritt wurden Fluoreszenz-gekoppeltes Streptavidin (0,125  $\mu\text{g}$ ) und alle zu analysierenden direkt gekoppelten Ak (0,5  $\mu\text{g}$ ) ebenfalls in je 25  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer für weitere 20-30 min zugegeben. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 300  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen. Vor der Messung wurde in jedes Röhrchen 0,1  $\mu\text{g}$  PI zugefügt. Als Software für die Analyse dienten Cellquest (BD, Heidelberg) oder FlowJo (TreeStar, Ashland, USA).

## 7.5 Immunhistologie

Während die Durchflusszytometrie die genaue Charakterisierung von Einzellzellen erlaubt, ist die Immunhistologie eine Methode um Zellen im Gewebeverband zu analysieren. Dabei werden Organschnitte mit spezifischen Ak inkubiert um bestimmte Zellpopulationen sichtbar zu machen. Im Gegensatz zur ICL-Präparation müssen die Mäuse vorher nicht perfundiert werden, weil Blutzellen durch ihre Lokalisation im Gefäß identifiziert werden können. Die Mäuse wurden in einer einer Äther-gesättigten Atmosphäre schmerzfrei getötet. Die Maus wurde dekapitiert, die Schädeldecke geöffnet und das Gehirn direkt entnommen, in -50 °C kaltem 2-Methylbutan schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Für die Anfertigung der Schnitte wurde das Gehirn im Kryostat eingespannt und in sagitaler Schnittebene wurden 10  $\mu\text{m}$  Schnitte angefertigt und auf Objektträger platziert. Die Kryoschnitte wurden anschließend 10 min in Aceton bei -20°C fixiert. Die Schnitte wurden zur Hemmung der endogenen Peroxidasen 15 min mit 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBS inkubiert und 5 min in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Schnitte für 30 min bei RT mit 3%-igem Serum aus der Spezies geblockt, in der der Sekundärantikörper generiert wurde. Danach wurden die Schnitte wieder 5 min bei RT in PBS

gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (1: 500 in PBS verdünnt) inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (1: 500 in PBS verdünnt) für 30 min bei RT inkubiert, gewaschen und das Vectastain ABC Reagenz für 30 min bei RT dazugegeben. Nach dem letzten Waschen wurde das Substrat so lange inkubiert, bis eine spezifische Färbung zu erkennen war. Die Reaktion wurde mit Aqua. dest abgestoppt und die Objektträger eingedeckelt.

## **8 Molekularbiologische Methoden**

Beim Arbeiten mit RNA muss darauf geachtet werden, eine Degradierung der RNA durch exogene RNasen zu verhindern. Da RNasen nicht wie DNasen durch Autoklavieren inaktiviert werden können, wurden alle mit RNA verwendeten Lösungen zur Eliminierung der RNasen mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Anschließend wurden die Lösungen autoklaviert, da so das DEPC zersetzt wird. Hitzeinstabile Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Aqua dest. angesetzt. Es wurden nur sterile, für die Arbeit mit RNA doppelt autoklavierte Plastikgefäße und sterile Plastikpipetten sowie gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Es wurde, ebenso wie beim Umgang mit DNA, nur mit Handschuhen gearbeitet.

### **8.1 Präparation von Gesamt-RNA**

Gesamt-RNA wurde durch die Lyse der Zellen mit Guanidinium-Isocyanat (GSCN) und anschließender Ultrazentrifugation des Lysats auf einem Cäsiumchlorid-Dichtekissen (Maniatis et al., 1989) isoliert. Die GSCN-Methode nutzt die Tatsache aus, dass RNA eine höhere Schwebedichte ( $1,9 \text{ g/cm}^3$ ) hat als andere Zellbestandteile. Bei der Zentrifugation pelletiert damit RNA, während DNA, Proteine und Lipide im Überstand bleiben.

Für die Präparation von Gesamt-RNA aus T-Zellen und ICL wurden  $15 \times 10^6$  Zellen pelletiert (10 min,  $300 \times g$ , 4°C), in 4 ml GSCN-Lösung aufgenommen und mit 3 ml DEPC-Wasser gemischt. In RNase-freien Polyallomer-Röhrchen (Beckmann, Krefeld) wurden 3 ml Cäsiumchlorid-Lösung vorgelegt und mit der Zellsuspension überschichtet. Die Röhrchen wurden mit DEPC-Wasser bis kurz unter den Rand befüllt und zum Schutz gegen Verdunsten mit Paraffinöl bedeckt und austariert. Der Gradient wurde in der Ultrazentrifuge für 16 h bei  $150.000 \times g$  und RT ohne

Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand über dem RNA-Pellet abgenommen. Das Pellet wurde trocken gelassen und zweimal mit eiskaltem 70 % Äthanol (-20°C, angesetzt mit DEPC-Wasser) gewaschen. Abschließend wurde die RNA in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentration wie unter 8.2 beschrieben bestimmt.

GSCN-Lösung:                    4 M Guanidinium-Isocyanat  
   20 mM Natrium-Acetat pH 5,2  
   0,1 mM DTT  
   0,5% N-Laurylsarkosin  
   sterilfiltriert

CsCl-Lösung:                    5,7 M Cäsiumchlorid  
   0,1 M EDTA pH 8,0  
   0,1% DEPC  
   über Nacht stehen lassen, anschließend autoklavieren

DEPC-Wasser: Aqua dest. mit 0,1 % DEPC über Nacht stehen lassen, anschließend autoklavieren

## 8.2 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung reiner RNA-Lösungen wurde in einem DNA/RNA Calculator II (Amersham) mit Quarzküvetten durchgeführt. Um im linearen Messbereich zu arbeiten, wurden alle Proben so verdünnt, dass eine maximale Absorption von 1 gemessen wurde. Die Kalibrierung erfolgte gegen DEPC-Wasser. Zur Berechnung der Konzentration wurde, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, folgende Beziehung verwendet:

$$1,0 A_{260} \cong 37 \mu\text{g ssNS/ml}$$

Zur Überprüfung der Reinheit von RNA-Lösungen wurde das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm bestimmt. Reine Präparationen sollten  $A_{260}/A_{280}$  Werte zwischen 1,7 und 2,0 besitzen und wurden für die cDNA-Synthese eingesetzt. Kontaminationen mit Proteinen führen zu deutlich geringeren Werten.

### 8.3 Synthese der cDNA

Um mRNA-Transkripte amplifizieren zu können, wurde die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde ausgehend von 1 µg Gesamt-RNA mit dem “Advantage™ RT-for-PCR Kit“ (BD Biosciences, Heidelberg) entsprechend den Herstellerangaben erzeugt. Die Synthese erfolgte mit “molony murine leukemia virus“-Reverse Transkriptase (MMLV-RT) nach Bindung des oligo dT-Primers am PolyA-Schwanz der mRNA.

### 8.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um eine erfolgreiche cDNA-Synthese nachzuweisen, wurde das Vorhandensein von cDNA mittels PCR überprüft. Dafür wurden G3PDH-Primer verwendet, die in der PCR spezifisch ein 1 kb großen Abschnitt des G3PDH-Gens amplifizieren. Um eine Mengenabschätzung vornehmen zu können, wurde die cDNA unverdünnt und 1:10 und 1:100 verdünnt eingesetzt.

Für die Amplifikation wurden in 25 µl Reaktionsvolumen 2,5 µl des cDNA-Ansatzes eingesetzt. Die dNTPs wurden mit einer Konzentration von je 200 µM, die G3PDH-Primer mit 400 nM und 0,625 U Taq-Polymerase eingesetzt. Der 10x Puffer mit einer MgCl-Konzentration von 1,5 mM wurde von Invitrogen bezogen. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programm:

Denaturierung	5 min	95°C	1 Zyklus
Denaturierung	30 s	95°C	35 Zyklen
Annealing	1 min	60°C	
Elongation	1 min	72°C	
Elongation	7 min	72°C	1 Zyklus

Die 1 kb großen PCR-Produkte wurden im Agarosegel (s. 8.5) elektrophoretisch aufgetrennt. Nur wenn bei einer 1:100 Verdünnung der cDNA noch ein G3PDH-Amplifikat im Agarosegel zu erkennen war, wurde die cDNA für die Realtime PCR (s. 8.6) eingesetzt.

## 8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von PCR-Produkten wurden horizontale Agarosegele mit 1 bis 2 % (w/v) Agarose in 1x TBE Puffer verwendet (Maniatis et al., 1989). Die aufgekochte Agaroselösung wurde mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, auspolymerisiert und als Flachbettgel in 1x TBE eingesetzt. Die PCR-Ansätze wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von ca. 6V/cm aufgetrennt. Auf jedem Gel wurde ebenfalls ein Größenstandard (1kb plus DNA-Leiter, Invitrogen) mitgeführt, um die Größe der Fragmente ermitteln zu können. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel über die Fluoreszenz des in den Doppelstrang interkalierenden Ethidiumbromids bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (340 nm) auf einem UV-Transilluminator (Herolab, Wiesloch) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden die Gele in der Geldokumentationskammer (Biometra, Göttingen) fotografiert.

## 8.6 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Realtime PCR)

Die Realtime RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines jeden PCR-Zyklus durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, indem eine spezifische Fluoreszenz-markierte Sonde, bei der die Fluorophore zuvor gequencht vorliegen, während der Polymerisierung abgebaut wird, und die Fluorophore freigesetzt werden. Für einen 25 µl Ansatz werden 12,5 µl qPCR Mastermix (Eurogentec) gemischt eingesetzt, der bereits dNTP und Polymerase enthält und die nötigen Pufferbedingungen bereitstellt. Dazu werden je 320 nM der Primer und 0,5 µl spezifisch auf die Reaktion abgestimmte Sonde gegeben und mit 5 µl der zu untersuchenden 1:5 verdünnten cDNA gemischt.

Durchführung der Reaktionszyklen im IQ5 PCR-Cycler (Biorad, München) unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung	7 min	95°C	1 Zyklus
Denaturierung	20 s	94°C	40 Zyklen
Annealing + Elongation	60 s	60°C	
Lagerung		4°C	1 Zyklus

Für die Auswertung der Realtime PCR Daten wurden die CT Werte mit Hilfe der iQ5 Software von der Firma Biorad ermittelt. Die  $\Delta\Delta CT$  Methode wurde zur Ermittlung der Expressionszunahme der einzelnen Gene zugrunde gelegt (Pfaffl, 2001).

## VI Referenzen

- Allt G, Lawrenson JG. 2001. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues.Organs* 169:1-11.
- Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179.
- Aloisi F, Ria F, Adorini L. 2000. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunology Today* 21:141-147.
- Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Briere F, Trinchieri G. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat.Immunol* 2:1144-1150.
- Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. 2006. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev.Immunol* 26:149-188.
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Bart J, Groen HJ, Hendrikse NH, van der Graaf WT, Vaalburg W, de Vries EG. 2000. The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treat.Rev.* 26:449-462.
- Basak SK, Harui A, Stolina M, Sharma S, Mitani K, Dubinett SM, Roth MD. 2002. Increased dendritic cell number and function following continuous in vivo infusion of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-4. *Blood* 99:2869-2879.
- Becher B, Barker PA, Owens T, Antel JP. 1998. CD95-CD95L: can the brain learn from the immune system? *Trends Neurosci.* 21:114-117.
- Becher B, Bechmann I, Greter M. 2006. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol.Med.* 84:532-543.
- Becher B, Prat A, Antel JP. 2000. Brain-immune connection: Immune-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 29:293-304.
- Bechmann I, Galea I, Perry VH. 2007. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol* 28:5-11.
- Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simburger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J. 2005. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J* 19:647-649.
- Bechmann I, Kwidzinski E, Kovac AD, Simburger E, Horvath T, Gimsa U, Dirnagl U, Priller J, Nitsch R. 2001a. Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp.Neurol.* 168:242-249.
- Bechmann I, Peter S, Beyer M, Gimsa U, Nitsch R. 2001b. Presence of B7--2 (CD86) and lack of B7--1 (CD(80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. *FASEB J* 15:1086-1088.

- Bilsborough J, George TC, Norment A, Viney JL. 2003. Mucosal CD8 $\alpha$ + DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108:481-492.
- Biondo M, Nasa Z, Marshall A, Toh BH, Alderuccio F. 2001. Local transgenic expression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor initiates autoimmunity. *J.Immunol.* 166:2090-2099.
- Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, 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. *J Exp.Med.* 197:101-109.
- Britschgi M, Wyss-Coray T. 2007. Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *Int.Rev.Neurobiol.* 82:205-233.
- Brook GA, Plate D, Franzen R, Martin D, Moonen G, Schoenen J, Schmitt AB, Noth J, Nacimient W. 1998. Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat. *J Neurosci.Res.* 53:51-65.
- Brown CR, Hunter CA, Estes RG, Beckmann E, Forman J, David C, Remington JS, McLeod R. 1995. Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. *Immunology* 85:419-428.
- Burger JA, Baird SM, Powell HC, Sharma S, Eling DJ, Kipps TJ. 2000. Local and systemic effects after adenoviral transfer of the murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene into mice. *Br.J.Haematol.* 108:641-652.
- Burgess AW, Metcalf D. 1980. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 56:947-958.
- Buschmann IR, Busch HJ, Mies G, Hossmann KA. 2003. Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* 108:610-615.
- Butcher EC. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036.
- Butcher EC, Williams M, Youngman K, Rott L, Briskin M. 1999. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv.Immunol* 72:209-253.
- Campbell IK, Bendele A, Smith DA, Hamilton JA. 1997. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor exacerbates collagen induced arthritis in mice. *Ann.Rheum.Dis.* 56:364-368.
- Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Dunn AR, Grail D, Hamilton JA. 1998a. Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *The Journal of Immunology* 161:3639-3644.

- Campbell IL, Stalder AK, Akwa Y, Pagenstecher A, Asensio VC. 1998b. Transgenic models to study the actions of cytokines in the central nervous system. *Neuroimmunomodulation*. 5:126-135.
- Carrieri PB, Provitera V, De Rosa T, Tartaglia G, Gorga F, Perrella O. 1998. Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: A correlation with clinical activity. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 20:373-382.
- Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. 1998. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* 22:72-85.
- Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. 1999. Disproportionate recruitment of CD8+ T cells into the central nervous system by professional antigen-presenting cells. *Am.J Pathol*. 154:481-494.
- Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, Haqqani AS, Kreymborg K, Krug S, Moundjian R, Bouthillier A, Becher B, Arbour N, David S, Stanimirovic D, Prat A. 2008. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat.Immunol* 9:137-145.
- Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-787.
- Cheung DL, Hamilton JA. 1992. Regulation of human monocyte DNA synthesis by colony-stimulating factors, cytokines, and cyclic adenosine monophosphate. *Blood* 79:1972-1981.
- Croft M. 1994. Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr.Opin.Immunol* 6:431-437.
- Cserr HF, Bundgaard M. 1984. Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *Am.J Physiol* 246:R277-R288.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat.Neurosci*. 8:752-758.
- de Boer AG, Gaillard PJ. 2006. Blood-brain barrier dysfunction and recovery. *J Neural Transm*. 113:455-462.
- Dickstein JB, Moldofsky H, Hay JB. 2000. Brain-blood permeability: TNF-alpha promotes escape of protein tracer from CSF to blood. *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 279:R148-R151.
- DiPersio J, Billing P, Kaufman S, Eghtesady P, Williams RE, Gasson JC. 1988. Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *J Biol.Chem*. 263:1834-1841.
- Doherty PC, Zinkernagel RM. 1975. Capacity of Sensitized Thymus-Derived Lymphocytes to Induce Fatal Lymphocytic Choriomeningitis Is Restricted by the H-2 Gene Complex. *The Journal of Immunology* 114:30-33.

- Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315:107-111.
- Engelhardt B, Ransohoff RM. 2005. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 26:485-495.
- Fabry Z, Topham DJ, Fee D, Herlein J, Carlino JA, Hart MN, Sriram S. 1995. TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. *The Journal of Immunology* 155:325-332.
- Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS. 1999. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp.Med.* 190:1155-1164.
- Filbin MT. 2003. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat.Rev.Neurosci.* 4:703-713.
- Fischer HG, Bielinsky AK. 1999. Antigen presentation function of brain-derived dendriform cells depends on astrocyte help. *Int.Immunol* 11:1265-1274.
- Fischer HG, Bonifas U, Reichmann G. 2000. Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology* 164:4826-4834.
- Fischer HG, Reichmann G. 2001. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *Journal of Immunology* 166:2717-2726.
- Fleetwood AJ, Cook AD, Hamilton JA. 2005. Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Crit Rev.Immunol* 25:405-428.
- Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. 2007. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *The Journal of Immunology* 178:5245-5252.
- Flugel A, Labeur MS, Grasbon-Frodl EM, Kreutzberg GW, Graeber MB. 1999. Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. *Int.J Dev.Neurosci.* 17:547-556.
- Fortin A, Stevenson MM, Gros P. 2002. Complex genetic control of susceptibility to malaria in mice. *Genes Immun.* 3:177-186.
- Franzen R, Bouhy D, Schoenen J. 2004. Nervous system injury: focus on the inflammatory cytokine 'granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor'. *Neuroscience Letters* 361:76-78.
- Franzen R, Schoenen J, Leprince P, Joosten E, Moonen G, Martin D. 1998. Effects of macrophage transplantation in the injured adult rat spinal cord: a combined immunocytochemical and biochemical study. *J Neurosci.Res.* 51:316-327.

- Gamble JR, Elliott MJ, Jaipargas E, Lopez AF, Vadas MA. 1989. Regulation of human monocyte adherence by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:7169-7173.
- Garden GA, Moller T. 2006. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune.Pharmacol.* 1:127-137.
- Giulian D, Li J, Li X, George J, Rutecki PA. 1994. The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. *Dev.Neurosci.* 16:128-136.
- Gomez-Cambronero J, Horn J, Paul CC, Baumann MA. 2003. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *The Journal of Immunology* 171:6846-6855.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2005. The B7 family revisited. *Annu.Rev.Immunol* 23:515-548.
- Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B. 2005. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat.Med.* 11:328-334.
- Guermonprez P, Fayolle C, Rojas MJ, Rescigno M, Ladant D, Leclerc C. 2002. In vivo receptor-mediated delivery of a recombinant invasive bacterial toxoid to CD11c + CD8 alpha - CD11bhigh dendritic cells. *Eur.J Immunol* 32:3071-3081.
- Ha Y, Park HS, Park CW, Yoon SH, Park SR, Hyun DK, Kim EY, Park HC. 2005. Synthes Award for Resident Research on Spinal Cord and Spinal Column Injury: granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) prevents apoptosis and improves functional outcome in experimental spinal cord contusion injury. *Clin.Neurosurg.* 52:341-347.
- Hamilton JA. 1993. Colony stimulating factors, cytokines and monocyte-macrophages--some controversies. *Immunol Today* 14:18-24.
- Hamilton JA. 2002. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol* 23:403-408.
- Hamilton JA. 2008. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat.Rev.Immunol* 8:533-544.
- Hamilton JA, Stanley ER, Burgess AW, Shadduck RK. 1980. Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors. *J Cell Physiol* 103:435-445.
- Hanly A, Petito CK. 1998. HLA-DR-positive dendritic cells of the normal human choroid plexus: a potential reservoir of HIV in the central nervous system. *Hum.Pathol.* 29:88-93.
- Hapel AJ. 1975. The protective role of thymus-derived lymphocytes in arbovirus-induced meningoencephalitis. *Scand.J.Immunol.* 4:267-278.

- Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Royston K, Hamilton JA. 1991. Activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: increased urokinase-type plasminogen activator activity. *Blood* 77:841-848.
- Havenith CE, Askew D, Walker WS. 1998. Mouse resident microglia: isolation and characterization of immunoregulatory properties with naive CD4+ and CD8+ T-cells. *Glia* 22:348-359.
- Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, Yamamoto H. 1997. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19:13-26.
- Henkel JS, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH. 2004. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann.Neurol.* 55:221-235.
- Hickey WF. 2001. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36:118-124.
- Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. 1991. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci.Res.* 28:254-260.
- Hickey WF, Kimura H. 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239:290-292.
- Hickey WF, Vass K, Lassmann H. 1992. Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 51:246-256.
- Hochrein H, Shortman K, Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'Keeffe M. 2001. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *The Journal of Immunology* 166:5448-5455.
- Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290:1768-1771.
- Hurwitz AA, Berman JW, Rashbaum WK, Lyman WD. 1993. Human fetal astrocytes induce the expression of blood-brain barrier specific proteins by autologous endothelial cells. *Brain Res.* 625:238-243.
- Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp.Med.* 176:1693-1702.
- Inaba K, Steinman RM. 1984. Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *J Exp.Med.* 160:1717-1735.

- Iwasaki A, Medzhitov R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol* 5:987-995.
- Jander S, Schroeter M, Fischer J, Stoll G. 2000. Differential regulation of microglial keratan sulfate immunoreactivity by proinflammatory cytokines and colony-stimulating factors. *Glia* 30:401-410.
- Juedes AE, Ruddle NH. 2001. Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 166:5168-5175.
- Kannan Y, Moriyama M, Sugano T, Yamate J, Kuwamura M, Kagaya A, Kiso Y. 2000. Neurotrophic action of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on murine sympathetic neurons. *Neuroimmunomodulation*. 8:132-141.
- Karman J, Ling CY, Sandor M, Fabry Z. 2004. Dendritic cells in the initiation of immune responses against central nervous system-derived antigens. *Immunology Letters* 92:107-115.
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu.Rev.Immunol* 26:677-704.
- Kleinschnitz C, Schroeter M, Jander S, Stoll G. 2004. Induction of granulocyte colony-stimulating factor mRNA by focal cerebral ischemia and cortical spreading depression. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 131:73-78.
- Kostulas N, Li HL, Xiao BG, Huang YM, Kostulas V, Link H. 2002. Dendritic cells are present in ischemic brain after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 33:1129-1134.
- Kwidzinski E, Bunse J, Aktas O, Richter D, Mutlu L, Zipp F, Nitsch R, Bechmann I. 2005. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *FASEB J* 19:1347-1349.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu.Rev.Immunol* 14:233-258.
- Li Y, Chen J, Chopp M. 2001. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant.* 10:31-40.
- Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223:77-92.
- Maehlen J, Olsson T, Zachau A, Klareskog L, 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. *J Neuroimmunol.* 23:125-132.
- Magnus T, Chan A, Grauer O, Toyka KV, Gold R. 2001. Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *The Journal of Immunology* 167:5004-5010.

- Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Moser M. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp.Med.* 189:587-592.
- Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM. 2007. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathol.* 17:243-250.
- Mark KS, Miller DW. 1999. Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF-alpha exposure. *Life Sci.* 64:1941-1953.
- Martin P, Del Hoyo GM, Anjuere F, Arias CF, Vargas HH, Fernandez L, Parrillas V, Ardavin C. 2002. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100:383-390.
- Marusic S, Miyashiro JS, Douhan J, III, Konz RF, Xuan D, Pelker JW, Ling V, Leonard JP, Jacobs KA. 2002. Local delivery of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by retrovirally transduced antigen-specific T cells leads to severe, chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neurosci.Lett.* 332:185-189.
- Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M. 1992. Immune regulation by brain cells in the central nervous system: microglia but not astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T cells under in vivo-mimicking conditions. *Immunology* 76:209-216.
- Matyszak MK, Perry VH. 1996. The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience* 74:599-608.
- McLay RN, Kimura M, Banks WA, Kastin AJ. 1997. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor crosses the blood--brain and blood--spinal cord barriers. *Brain* 120 ( Pt 11):2083-2091.
- McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. 2005. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat.Med.* 11:335-339.
- McMahon EJ, Bailey SL, Miller SD. 2006. CNS dendritic cells: Critical participants in CNS inflammation? *Neurochemistry International* 49:195-203.
- McMenamin PG. 1999. Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J.Comp Neurol.* 405:553-562.
- McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CCA. 2001. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: A new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine* 194:873-881.
- Medawar PB. 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. *Br.J.Exp.Pathol.* 29:58-69.
- Mellor AL, Munn DH. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat.Rev.Immunol* 4:762-774.

- Miller G, Pillarisetty VG, Shah AB, Lahrs S, Xing Z, DeMatteo RP. 2002. Endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor overexpression in vivo results in the long-term recruitment of a distinct dendritic cell population with enhanced immunostimulatory function. *Journal of Immunology* 169:2875-2885.
- Nakagawa T, Suga S, Kawase T, Toda M. 2006. Intracarotid injection of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces neuroprotection in a rat transient middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res.* 1089:179-185.
- Nicola NA, Smith A, Robb L, Metcalf D, Begley CG. 1997. The structural basis of the biological actions of the GM-CSF receptor. *Ciba Found.Symp.* 204:19-27.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Soderstrom M, Link H. 2001. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 124:480-492.
- Pashenkov M, Teleshova N, Kouwenhoven M, Smirnova T, Jin YP, Kostulas V, Huang YM, Pinegin B, Boiko A, Link H. 2002. Recruitment of dendritic cells to the cerebrospinal fluid in bacterial neuroinfections. *J Neuroimmunol.* 122:106-116.
- Penna G, Sozzani S, Adorini L. 2001. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of Immunology* 167:1862-1866.
- Perry VH. 1998. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol.* 90:113-121.
- Perry VH, Andersson PB, Gordon S. 1993. Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci.* 16:268-273.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:45.
- Plumb J, Armstrong MA, Duddy M, Mirakhur M, McQuaid S. 2003. CD83-positive dendritic cells are present in occasional perivascular cuffs in multiple sclerosis lesions. *Mult.Scler.* 9:142-147.
- Power CA, Proudfoot AE. 2001. The chemokine system: novel broad-spectrum therapeutic targets. *Curr.Opin.Pharmacol.* 1:417-424.
- Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat.Rev.Immunol* 3:569-581.
- Re F, Belyanskaya SL, Riese RJ, Cipriani B, Fischer FR, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, Brosnan C, Stern LJ, Strominger JL, Santambrogio L. 2002. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation. *The Journal of Immunology* 169:2264-2273.

- Reichmann G, Dlugonska H, Fischer HG. 1997. T cell receptor specificities of *Toxoplasma gondii*-reactive mouse CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and Th1 clones. *Med.Microbiol.Immunol* 186:25-30.
- Reichmann G, Schroeter M, Jander S, Fischer HG. 2002. Dendritic cells and dendritic-like microglia in focal cortical ischemia of the mouse brain. *Journal of Neuroimmunology* 129:125-132.
- Rosicarelli B, Serafini B, Sbriccoli M, Lu M, Cardone F, Pocchiari M, Aloisi F. 2005. Migration of dendritic cells into the brain in a mouse model of prion disease. *J Neuroimmunol.* 165:114-120.
- Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur.J Immunol* 28:2760-2769.
- Sanford KK, Earle WR, Likely GD. 1948. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl.Cancer Inst.* 9:229-246.
- Santambrogio L, Belyanskaya SL, Fischer FR, Cipriani B, Brosnan CF, Ricciardi-Castagnoli P, Stern LJ, Strominger JL, Riese R. 2001. Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:6295-6300.
- Sawada M, Itoh Y, Suzumura A, Marunouchi T. 1993. Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells. *Neurosci.Lett.* 160:131-134.
- Schabitz WR, Kruger C, Pitzer C, Weber D, Laage R, Gassler N, Aronowski J, Mier W, Kirsch F, Dittgen T, Bach A, Sommer C, Schneider A. 2008. A neuroprotective function for the hematopoietic protein granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *J Cereb.Blood Flow Metab* 28:29-43.
- Schachner M, Sidman RL. 1973. Distribution of H-2 alloantigen in adult and developing mouse brain. *Brain Res.* 60:191-198.
- Schermer C, Humpel C. 2002. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor activates microglia in rat cortex organotypic brain slices. *Neurosci.Lett.* 328:180-184.
- Schluter D, Lohler J, Deckert M, Hof H, Schwendemann G. 1991. *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. *J Neuroimmunol.* 31:185-198.
- Schmid CD, Sautkulis LN, Danielson PE, Cooper J, Hasel KW, Hilbush BS, Sutcliffe JG, Carson MJ. 2002. Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J Neurochem.* 83:1309-1320.
- Schmitt E, Van Brandwijk R, Fischer HG, Rude E. 1990. Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors. *Eur.J Immunol* 20:1709-1715.

- Schneeloch E, Mies G, Busch HJ, Buschmann IR, Hossmann KA. 2004. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced arteriogenesis reduces energy failure in hemodynamic stroke. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:12730-12735.
- Sedgwick JD, Ford AL, Foulcher E, Airriess R. 1998. Central nervous system microglial cell activation and proliferation follows direct interaction with tissue-infiltrating T cell blasts. *The Journal of Immunology* 160:5320-5330.
- Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher GW, ter M, V. 1991. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:7438-7442.
- Serafini B, Columba-Cabezas S, Di Rosa F, Aloisi F. 2000. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am.J Pathol.* 157:1991-2002.
- Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Capello E, Mancardi GL, Aloisi F. 2006. Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 65:124-141.
- Serot JM, Bene MC, Foliguet B, Faure GC. 2000. Monocyte-derived IL-10-secreting dendritic cells in choroid plexus epithelium. *J Neuroimmunol.* 105:115-119.
- Shinkura R, Kitada K, Matsuda F, Tashiro K, Ikuta K, Suzuki M, Kogishi K, Serikawa T, Honjo T. 1999. A lymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding Nf-kappa b-inducing kinase. *Nat.Genet.* 22:74-77.
- Shortman K, Liu YJ. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat.Rev.Immunol* 2:151-161.
- Shortman K, Naik SH. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Reviews Immunology* 7:19-30.
- Shrikant P, Benveniste EN. 1996. The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *The Journal of Immunology* 157:1819-1822.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 150:76-85.
- Springer TA. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.
- Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, Maher DW, Cebon J, Sinickas V, Dunn AR. 1994. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:5592-5596.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol* 21:685-711.

- Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp.Med.* 191:411-416.
- Streit WJ, Graeber MB. 1993. Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm. *Glia* 7:68-74.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. *Prog.Neurobiol.* 57:563-581.
- Suter T, Biollaz G, Gatto D, Bernasconi L, Herren T, Reith W, Fontana A. 2003. The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation. *European Journal of Immunology* 33:2998-3006.
- Suter T, Malipiero U, Otten L, Ludewig B, Muelethaler-Mottet A, Mach B, Reith W, Fontana A. 2000. Dendritic cells and differential usage of the MHC class II transactivator promoters in the central nervous system in experimental autoimmune encephalitis. *European Journal of Immunology* 30:794-802.
- Suzuki Y, Joh K, Kwon OC, Yang Q, Conley FK, Remington JS. 1994. MHC class I gene(s) in the D/L region but not the TNF-alpha gene determines development of toxoplasmic encephalitis in mice. *The Journal of Immunology* 153:4649-4654.
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelso C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. 1997. Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clin.Exp.Immunol.* 110:492-499.
- Tarkowski E, Wallin A, Regland B, Blennow K, Tarkowski A. 2001. Local and systemic GM-CSF increase in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Acta Neurologica Scandinavica* 103:166-174.
- Taylor AW, Streilein JW. 1996. Inhibition of antigen-stimulated effector T cells by human cerebrospinal fluid. *Neuroimmunomodulation.* 3:112-118.
- Trifilo MJ, Lane TE. 2004. The CC chemokine ligand 3 regulates CD11c+CD11b+CD8alpha-dendritic cell maturation and activation following viral infection of the central nervous system: implications for a role in T cell activation. *Virology* 327:8-15.
- Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, Di Pucchio T, Connolly J, Fay JW, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev.* 219:118-142.
- Ulvestad E, Williams K, Bjerkvig R, Tiekotter K, Antel J, Matre R. 1994. Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *J Leukoc.Biol.* 56:732-740.
- van der Veen RC. 2001. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int.Immunopharmacol.* 1:1491-1500.
- von Stebut E, Udey MC. 2004. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes.Infect.* 6:1102-1109.

- von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. 2006. Pericytes and vascular stability. *Exp.Cell Res.* 312:623-629.
- Wang J, Snider DP, Hewlett BR, Lukacs NW, Gauldie J, Liang H, Xing Z. 2000. Transgenic expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the differentiation and activation of a novel dendritic cell population in the lung. *Blood* 95:2337-2345.
- Wei R, Jonakait GM. 1999. Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *J Neuroimmunol.* 95:8-18.
- Weiss JM, Berman JW. 1998. Astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1 is differentially regulated by transforming growth factor beta. *J Neuroimmunol.* 91:190-197.
- Whetton AD, Dexter TM. 1989. Myeloid haemopoietic growth factors. *Biochim.Biophys.Acta* 989:111-132.
- Winsser J, Verlinde JD. 1948. <Isolation of toxoplasma from cerebrospinal fluid of a living infant in Holland. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 67:292-294.
- Zameer A, Hoffman SA. 2003. Increased ICAM-1 and VCAM-1 expression in the brains of autoimmune mice. *J Neuroimmunol.* 142:67-74.

## VII Anhang

### 1 Abkürzungsverzeichnis

A <sub>260</sub>	Absorption bei 260nm
Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle(n)
Ak	Antikörper
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
B/c	BALB/c
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BL6	C57BL/6
BMDC	aus Knochenmarkszellen gereifte dendritische Zellen
BMNC	„brain mononuclear cell“
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	DNA-Kopie der mRNA (komplementäre DNA)
CD	“cluster of differentiation”
cpm	“counts per minute”
CSF	Kolonie stimulierender Faktor
CT	„cycle threshold“
ctrl.	Kontrolle
DC	Dendritische Zelle(n)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EAE	experimentelle Autoimmune Enzephalitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	“enzyme linked immuno sorbent assay”
FACS	“fluorescence-activated cell scan”
FCS	Fötales Kälberserum
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G	<i>gauge</i>
GFAP	Glia-fibrilläres-azides Protein
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulocyten Makrophagen- Kolonie stimulierender Faktor
GSCN	Guanidinium-Isothiocyanat
h	Stunde(n)
ICL	Intrazerebrale Leukozyten
i.c.v.	intrazerebroventrikulär
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
kD	Kilodalton
LN	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MACS	“magnetic cell sorting”

Mg	Mikroglia
MHC	“major histocompatibility complex”
min	Minute(n)
MLR	“mixed leukocyte reaction”
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
mRNA	Boten-RNA
MS	multiple Sklerose
PBS	“phosphate buffered saline”
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PPD	Tuberkulin (“purified protein derivate”)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription und PCR
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TdR	Thymidindesoxyribose
TE	<i>Toxoplasma</i> Enzephalitis
TLA	<i>Toxoplasma</i> -Lysat
TLR	„toll-like“-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
ZNS	Zentralnervensystem
ZNS-DC	DC im ZNS

## 2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Klaus Pfeffer, der mir in seinem Institut stets Forschung in einem herausragenden wissenschaftlichen Arbeitsklima ermöglicht hat und auf diese Weise Begeisterung für die Wissenschaft lehrt.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Schmitt für die freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit von Seiten der Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Ein großes Dankeschön geht an meine Arbeitsgruppe, vor allem aber an Dr. Gaby Reichmann, die mir gerade in den Anfängen meiner Arbeit immer zur Seite stand.

Mein großer Dank geht an Prof. Dr. Jander in der Neurologie, ohne den diese Experimente nicht möglich gewesen wären. Die gute Zusammenarbeit mit ihm und seiner Klinik hat dieser Arbeit den neuroimmunologischen Feinschliff gegeben. Auch die Diskussionen mit Gerd Meyer zu Hörste haben mich immer ein Stück weiter geführt.

Dankeschön an Dr. Steffi Scheu für das Korrekturlesen des Manuskripts und die stete wissenschaftliche Diskussion.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Sandra Beer, die immer da ist, wenn man sie braucht.

Es gibt viele Leute in unserem Institut, denen mein besonderer Dank gilt: Bernhard, Conny, Daniel, Felix, Max und Silke – ohne Euch hätte die Doktorarbeit nur halb so viel Spaß gemacht und wäre damit auch nicht so erfolgreich verlaufen.

Mein größter Dank geht an meine Familie und meine Freunde außerhalb des Labors, die mich stets unterstützt und motiviert haben und mir in allen Lebenslagen Halt und Geborgenheit gegeben haben.

### **3 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegeben Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den 27.04.2009

Anne-Kathrin Mausberg