

Aus der Neurologischen Klinik der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung

**In-vitro-Charakterisierung der Fähigkeit von Schwann-Zellen zur  
Stimulation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch  
Antigenpräsentation auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Holger Heidenreich**

**2011**

Als Inauguraldissertation gedruckt  
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Prof. Dr. Kieseier  
Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Neuen-Jacob

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Meyer zu Horste, G., Heidenreich, H. et al. (2010). "Expression of antigen processing and presenting molecules by Schwann cells in inflammatory neuropathies." *Glia* 58(1): 80-92.

Meyer zu Horste, G., Heidenreich, H. et al. (2010). "Mouse Schwann cells activate MHC class I and II restricted T-cell responses, but require external peptide processing for MHC class II presentation." *Neurobiol Dis* 37(2): 483-90.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1	Das Nervensystem .....	1
1.1	Die verschiedenen Zellen des Nervengewebes .....	2
1.1.1	Schwann-Zellen – die myelinbildenden Gliazellen des PNS .....	3
2	Erkrankungen des PNS .....	4
2.1	Inflammatorische Neuropathien .....	5
2.1.1	Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS).....	5
2.1.2	Pathogenetisch relevante Faktoren inflammatorischer Neuropathien .....	7
3	Funktionsweisen des Immunsystems .....	8
3.1	Aktivierung naiver T-Zellen zu spezifischen Effektorzellen .....	10
3.1.1	Das 1. Signal: Die TCR-MHC-Interaktion .....	11
3.1.2	Das kostimulatorische Signal.....	12
3.2	Entstehung der Selbst-Toleranz und Autoreaktivität von T-Zellen .....	13
3.3	Prozessierung und Präsentation von Antigen.....	15
3.3.1	Proteasomale Prozessierung und Präsentation auf MHC-I-Molekülen .....	16
3.3.2	Lysosomale Prozessierung und Präsentation auf MHC-II-Molekülen .....	17
3.3.3	Überschneidungen beider Antigenprozessierungspfade .....	18
4	Induktion lokaler immunologischer Prozesse im PNS .....	19
4.1	Schwann-Zellen in entzündlich veränderter Umgebung.....	21
4.1.1	Expression von MHC-Molekülen auf Schwann-Zellen.....	22
4.1.2	Schwann-Zellen exprimieren für die Antigenprozessierung notwendige Moleküle .....	23
5	Zielsetzung der Arbeit .....	24
<b>II</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
1	Generell benötigtes Material .....	26
1.1	Technische Geräte und Arbeitsmaterialien .....	26
1.2	Software .....	28
1.3	Chemikalien und Bioreagenzien .....	28
1.4	Kits .....	30
2	Medien und Puffer .....	30
2.1	Zellkulturmedien .....	30
2.2	Medien für die Bakterienkultur .....	31

2.3	Puffer.....	32
3	Proteine.....	32
3.1	Antikörper.....	33
4	Molekularbiologisches Material.....	33
4.1	Plasmide.....	33
4.2	Enzyme.....	34
4.3	DNA-Größenstandard.....	34
4.4	Sequenzierungsprimer.....	34
4.5	DNA-Sequenzierung.....	35
4.6	Bakterienstämme.....	35
5	Eukaryontische Zelllinien.....	35
6	Mauslinien.....	36
7	Zellkultur.....	37
7.1	Einfrieren und Auftauen.....	37
7.2	Zellen passagieren.....	37
7.3	Zellzahlbestimmung.....	38
7.4	Kultivierung von Stimulatorzellen.....	39
7.4.1	Konditionell immortalisierte murine Schwann-Zellen.....	39
7.4.2	Kultivierung der konditionell immortalisierten murinen Schwann-Zellen.....	39
7.4.3	Generierung von murinen dendritischen Zellen aus Knochenmark.....	40
7.5	Kultivierung von Responderzellen.....	41
7.5.1	Isolierung von OT-Zellen.....	41
7.5.2	Intrazellulärfärbung mit Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester (CFSE).....	42
7.6	Kokultivierung von Stimulator- und Responderzellen.....	43
7.7	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	43
7.8	Selektion transfizierter Zellen.....	44
8	Molekularbiologische Methoden.....	45
8.1	Restriktionsverdau von DNA.....	45
8.2	DNA-Elektrophorese in Agarosegelen.....	45
8.3	Elution von DNA aus Agarosegelen.....	46
8.4	Konzentrationsbestimmung von gelöster DNA.....	46
8.5	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	47
8.6	Ligation von DNA.....	47

8.7	DNA-Transformation in chemisch kompetente Bakterien.....	47
8.8	Präparation von Plasmid-DNA .....	48
8.8.1	Schnellpräparation .....	48
8.8.2	Endotoxinfreie Großpräparation .....	48
9	Immunologische Methoden .....	49
9.1	MACS (Magnetic-activated cell sorting) .....	49
9.2	Immunzytochemie/Indirekte Immunfluoreszenz (ICC/IF) .....	49
9.3	Antigenunabhängige Stimulation muriner T-Zellen .....	50
9.4	Durchflusszytometrie/FACS (Fluorescence-activated cell scanning).....	51
<b>III</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>54</b>
1	Analyse der Stimulatorzellen .....	54
1.1	Expression von Differenzierungsmarkern auf Schwann-Zellen .....	54
1.2	Generierung Ovalbumin exprimierender Schwann-Zellen .....	55
1.2.1	Klonierung der Ovalbumin-cDNA aus pAC-Neo-OVA in pIRES2-DsRed-Express .....	55
1.2.2	Nachweis von Ovalbumin in transfizierten Schwann-Zellen .....	57
1.3	MHC-Expressionsanalyse von Schwann-Zellen und BMDC .....	59
2	Analyse der Responderzellen .....	62
2.1	Durchflusszytometrische Messung der T-Zell-Proliferation.....	62
2.2	Schwann-Zell-induzierte Proliferation antigenspezifischer T-Zellen.....	63
2.2.1	Stimulation von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen durch Schwann-Zellen via MHC-I-Präsentation.....	65
2.2.2	Stimulation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen durch Schwann-Zellen via MHC-II-Präsentation.....	68
<b>IV</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
1	Kritische Bewertung des Kokulturmodells .....	73
1.1	Konditionell immortalisierte Schwann-Zellen als <i>in-vitro</i> -Modell myelinkompetenter Schwann-Zellen .....	73
1.2	Störfaktoren seitens der Responderzellen .....	74
1.3	Potenzielle zytotoxische Interaktionen zwischen Schwann-Zellen und OT-Zellen.....	75
1.4	Einsatz von IFN- $\gamma$ .....	76
2	Schwann-Zellen als konditionelle APC.....	76
2.1	Schwann-Zellen exprimieren funktionell relevante MHC-Moleküle und stimulieren antigenspezifische T-Zellen .....	77

2.2	Kreuzpräsentation durch Schwann-Zellen ist an der Stimulation spezifischer T-Zellen beteiligt .....	78
2.3	Relevanz der MHC-II-Präsentation durch Schwann-Zellen .....	80
2.4	Lokale MHC-I-Präsentation und zelluläre Immunabwehr als entscheidender Faktor bei der Induktion des Nervenschadens beim GBS.....	82
2.5	Die Bedeutung lokaler Antigenpräsentation im Rahmen nicht-inflammatorischer Neuropathien .....	83
3	Fazit .....	85
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
<b>VI</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>VII</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>103</b>
1	Abkürzungsverzeichnis .....	103
2	Danksagung .....	105
3	Eidesstattliche Erklärung.....	106
4	Curriculum vitae .....	107

# I Einleitung

## 1 Das Nervensystem

Zentrales und peripheres Nervensystem (ZNS und PNS) bilden zusammen das Kommunikations- und Steuerungsorgan des Körpers. Das ZNS umfasst das Gehirn und das Rückenmark und liegt innerhalb der schützenden knöchernen Strukturen von Schädel (Gehirn) und Wirbelsäule (Rückenmark). Es ist außerdem von drei bindegewebigen Hirn- bzw. Rückenmarkshäuten, den *Meningen* umgeben: der äußeren, sehr derben *Dura mater*, der darunterliegenden *Arachnoidea mater* sowie der *Pia mater*, welche der Hirn- und Rückenmarksoberfläche direkt aufliegt (Oda und Nakanishi 1984; Feurer und Weller 1991; Barshes et al. 2005). Die beiden inneren Meningen umschließen den mit *Liquor cerebrospinalis* gefüllten *Subarachnoidalraum* (äußerer Liquorraum), welcher mit Hohlräumen im Inneren des Gehirns (Ventrikel) sowie im Rückenmark (Zentralkanal), den inneren Liquorräumen, in Verbindung steht. Diese flüssigkeitsgefüllten Räume puffern Druckveränderungen im Schädelinneren ab und schützen das ZNS vor Erschütterungen (Di Terlizzi und Platt 2006). Ein dichtes Netzwerk aus Nervenzellen (Neuronen) bildet zusammen mit anderen Zellen (siehe 1.1) das ZNS-Gewebe, welches in der Hirnrinde sowie tiefer gelegenen Kerngebieten (Nuclei), der sogenannten grauen Hirnsubstanz, die Zellkörper (Perikarya) der ZNS-Neuronen und in der dazwischenliegenden weißen Hirnsubstanz deren Fortsätze enthält. Im ZNS werden ankommende elektrische Erregungen aus der Peripherie integrativ verarbeitet und koordiniert und durch ausgehende Signale die Körpertätigkeit gesteuert.

Das PNS umfasst alle Abschnitte des Nervensystems, welche nicht dem ZNS zuzurechnen sind, und beginnt an der Stelle, an welcher Nervenfasern in Form von Hirn- (auf Gehirnebene) bzw. Spinalnerven (auf Rückenmarksebene) aus dem ZNS aus- bzw. ins ZNS eintreten. Es besteht überwiegend aus Nervenfasern, welche Impulse von der Peripherie zum ZNS (afferent) oder vom ZNS in die Peripherie (efferent) leiten. An manchen Stellen des peripheren Nervengeflechts existieren Verdickungen, die sogenannten Ganglien, welche die Perikarya der PNS-Neuronen enthalten. Die Fortsätze der Neuronen bilden zusammen mit weiteren strukturellen Bestandteilen die Einheit eines peripheren Nerven. Einzelne Nervenfasern lagern sich zu einem Faszikel zusammen. Sie sind dabei jeweils durch eine Basalmembran von dem sie umgebenden Gewebe, dem Endoneurium, getrennt. Dieses besteht aus Kollagenfasern und retikulären Fasern und führt feine Blut- und Lymphgefäße.



Einzelne Faszikel werden mitsamt dem Endoneurium von einem mehrschichtigen, kollagenfaserreichen Perineurium umschlossen. Mehrere Faszikel werden schließlich durch lockeres Bindegewebe, das Epineurium, zu einem Nerven zusammengefasst (Sunderland 1990; Du Plessis et al. 1996). Die peripheren Nerven durchziehen als die reizleitenden Strukturen den Körper bis in die äußersten Bereiche.

ZNS und PNS sind funktionell untrennbar und gehen auch strukturell kontinuierlich ineinander über. Das Nervensystem ermöglicht die Aufnahme und Verarbeitung von Sinnesreizen in Form von elektrischen Potenzialen sowie die Koordinierung und Steuerung von motorischen, vegetativen sowie höheren Hirnfunktionen. Es bildet damit die Grundlage für die Interaktion eines Individuums mit seiner Umwelt.

### **1.1 Die verschiedenen Zellen des Nervengewebes**

Die wichtigsten Zellen des Nervengewebes sind die Neuronen, welche auf die Fortleitung elektrischer Impulse spezifiziert sind und damit die Aufnahme und Übermittlung von Reizen aus der Umgebung und dem Körper sowie die Steuerung von Körperfunktionen ermöglichen. Neuronen bestehen aus dem Perikaryon, welches den Zellkern und einen Großteil weiterer Zellorganellen enthält, sowie aus verschiedenen Fortsätzen. Über Dendriten gelangen elektrische Erregungen zum Perikaryon, von wo aus sie über ein einzelnes, sich im Verlauf verzweigendes Axon an andere Neuronen oder Körperzellen weitergeleitet werden. Die Signalübermittlung zwischen den Zellen erfolgt an sogenannten Synapsen durch die Sekretion von Neurotransmittern.

Sowohl das dichte Neuronengeflecht des ZNS als auch das periphere Nervengewebe enthält neben den Neuronen weitere Zellen, welche in ihrer Gesamtheit die sogenannte Neuroglia bilden. Zu den Gliazellen des ZNS zählen die Oligodendrozyten, die Astrozyten sowie die Mikrogliazellen. Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden (siehe 1.1.1) der ZNS-Neuronen. Astrozyten stehen in engem Kontakt mit Neuronen und schützen diese vor schädigenden Einflüssen. Sie kontrollieren die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix im ZNS-Gewebe, indem sie die Konzentration von Elektrolyten und anderen Metaboliten in der extrazellulären Flüssigkeit regulieren. An Synapsen sind sie an der Aufrechterhaltung der Homöostase von Neurotransmittersubstanzen im synaptischen Spalt und damit an der Regulierung der neuronalen Aktivität beteiligt (Vernadakis 1988; Daikhin und Yudkoff 2000; Struzynska 2009). Zudem können sie Hirnparenchymschäden durch Bildung einer gliösen Narbe decken (Yu et al. 1993). Mikrogliazellen gelten als ZNS-residente, den Makrophagen

ähnliche Abwehrzellen. Hinzu kommen die Schwann-Zellen, welche die Gliazellen des PNS darstellen.

### 1.1.1 Schwann-Zellen – die myelinbildenden Gliazellen des PNS

Die Myelinisierung von Neuronen erfolgt im ZNS durch Oligodendrozyten, während Schwann-Zellen die myelinbildenden Gliazellen des PNS darstellen. Eine Myelinscheide entsteht, indem sich eine Schwann-Zelle (bzw. im ZNS ein Oligodendrozyt) mehrfach um ein Axon windet, so dass sich mehrere Lagen ihrer Plasmamembran dicht aneinanderlagern. Während dieses Prozesses differenzieren diese Plasmamembranlamellen und bilden eine kompakte Hülle aus Myelin, welches einen gegenüber normalen Zellmembranen erhöhten Lipidanteil aufweist (Garbay et al. 2000). Während ein Oligodendrozyt jeweils mehrere Axone umschleiden kann, umhüllt eine Schwann-Zelle nur ein einzelnes Axon mit einer Myelinscheide. Das Axon wird so in seinem Verlauf durch mehrere hintereinanderliegende Schwann-Zellen mit einer Myelinscheide umgeben. Dadurch weist die Myelinscheide in regelmäßigen Abständen, jeweils an den Schwann-Zell-Enden, feine Unterbrechungen, die sogenannten Ranvier-Schnürringe (Nodien) auf. Die myelinisierten Abschnitte des Axons zwischen zwei Ranvier-Schnürringen (Internodien) werden aufgrund der elektrisch isolierenden Eigenschaften des Myelins bei der Reizleitung übersprungen. Diese saltatorische Erregungsleitung ist deutlich schneller als die kontinuierliche Reizleitung in Nervenfasern ohne Myelinscheide und hat sich evolutionär als ein entscheidender Vorteil erwiesen.

Neben der Myelinisierung von Neuronen sind Schwann-Zellen maßgeblich an der Nervenregeneration nach Verletzungen peripherer Nerven beteiligt. Bei der Durchtrennung eines Axons kommt es zur Waller-Degeneration des distalen Axonanteils. In dieser Situation kann eine Dedifferenzierung der Schwann-Zellen im Gebiet der Verletzung beobachtet werden, während derer sie innerhalb von 2 Tagen ihre Myelinsynthese drosseln (LeBlanc und Poduslo 1990). Sie sondern ovoide Fragmente ihrer Myelinscheiden ab und ordnen sich zu sogenannten Büngner-Bändern an, welche als Leitschienen für neu aussprossende Axone dienen (Stoll et al. 2002).

## 2 Erkrankungen des PNS

Erkrankungen des PNS sind gekennzeichnet durch eine direkte Schädigung von Nervenfasern oder auch durch eine Affektion weiterer Strukturen eines peripheren Nerven. Diese Erkrankungen werden allgemein als Neuropathien, oder bei Befall mehrerer Nerven als Polyneuropathien bezeichnet. Es können grundsätzlich zwei unterschiedliche Schädigungsmuster zugrundeliegen: eine Schädigung der Nervenfasern (Axone) selbst führt zu einer schwerpunktmäßig axonalen Neuropathie, eine Degeneration der Myelinscheiden dagegen zu einer demyelinisierenden Neuropathie. Eine axonale Schädigung hat eine Verminderung der Signalstärke von Nervenimpulsen zur Folge, was sich in elektrophysiologischen Untersuchungen als Amplitudenminderung abgeleiteter Muskelsummenaktionspotenziale zeigt. Eine Demyelinisierung äußert sich vor allem in einer Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG). Häufig sind Merkmale beider Manifestationstypen zu finden. Es können sowohl sensible als auch motorische sowie auch vegetative Störungen auftreten, je nachdem, welche Nervenfasertypen befallen sind (Zochodne 1999; Kanda 2007; Rader und Barry 2009).

Die Ursachen für Neuropathien sind vielfältig. Die diabetische Polyneuropathie als ein Beispiel für eine metabolisch bedingte Neuropathie macht etwa 30% der Neuropathien aus. Neben Diabetes ist Alkoholabusus mit ca. 25% eine häufige Ursache metabolischer Neuropathien in der westlichen Welt. In weiteren 35% ist die Neuropathie idiopathisch, d. h. ohne erkennbare Ursache. Ca. 10% der Neuropathien sind paraneoplastisch und treten im Rahmen einer malignen Grunderkrankung auf (George und Twomey 1986; Verghese et al. 2001). Medikamentös-toxische Neuropathien werden – selten – nach Einnahme von bestimmten Medikamenten wie Isoniazid oder Nitrofurantoin beobachtet. Daneben gibt es eine Reihe bakterieller (Mykobakterien, Borrelien) und viraler Erreger (humanes T-lymphotropes Virus 1 (HTLV-1), Humanes Immundefizienzvirus (HIV)), welche direkt oder indirekt periphere Nerven schädigen und eine (para-)infektiöse Neuroapthie verursachen können (Roman 1998). Bei bis zu 20% der HIV-positiven Patienten treten – nicht selten auch als Nebenwirkung antiretroviraler Therapie – neuropathische Symptome auf (Wright et al. 2008). Der Nervenschaden bei Neuropathien kann, abhängig von der Ursache der Erkrankung, auf einer direkten schädigenden Wirkung toxischer Stoffwechselprodukte oder Medikamente (metabolische und medikamentös-toxische Neuropathien) sowie mikrobieller Toxine (infektiöse Neuropathien) auf Nervengewebe beruhen. Hereditäre Neuropathien wie die Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie führen dagegen durch genetisch bedingte

Veränderungen bestimmter Myelin- oder Axonbestandteile zu einer Degeneration der Myelinscheiden peripherer Nerven (Meyer zu Horste et al. 2006). Inflammatorische Neuropathien stellen eine gesonderte Gruppe dar (ca. 10%), bei welchen das Immunsystem selbst schädigenden Einfluss auf das Nervensystem nimmt.

## 2.1 Inflammatorische Neuropathien

Erkrankungen aus dem Formenkreis der inflammatorischen Neuropathien führen zu zum Teil schwersten neurologischen Defiziten. Gemeinsam ist diesen Krankheitsbildern eine autoimmun bedingte Schädigung peripherer Nerven, welche auf einer Immunreaktion gegen bestimmte, im PNS lokalisierte Autoantigene beruht (Griffin und Sheikh 2005; Hughes und Cornblath 2005; Creange et al. 2006). In diese Erkrankungsgruppe gehören das Guillain-Barré-Syndrom (GBS), die chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP) und die multifokale motorische Neuropathie (MMN) sowie weitere Subtypen. Das akute GBS als Prototyp inflammatorischer Neuropathien soll im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

### 2.1.1 Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS)

Das GBS bezeichnet eine akute Entzündung von peripheren Nerven (Polyneuritis) sowie Nervenwurzeln (Polyradikulitis), welche mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 2 – 4 pro 100.000 Einwohner gehäuft Erwachsene mit einem leichten Überwiegen männlicher Personen betrifft (Alter 1990; Hughes und Rees 1997). Es lassen sich zwei primär axonale Formen, die akute axonale motorische Neuropathie (AMAN, von engl. *acute motor axonal neuropathy*) und die akute axonale sensomotorische Neuropathie (AMSAN, von engl. *acute motor sensory axonal neuropathy*) unterscheiden (Feasby et al. 1986; Yuki et al. 1990; McKhann et al. 1993; Griffin et al. 1995; Lugaesi et al. 1997). In der westlichen Welt kommen dagegen vorwiegend die demyelinisierenden Formen vor, welche als akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (AIDP) bzw. akute motorische demyelinisierende Neuropathie (AMDN) bezeichnet werden (Van der Meché et al. 2001). In 80% der Fälle können sensomotorische, in knapp 20% rein motorische Symptome beobachtet werden. Eine seltene Sonderform ist das Miller-Fisher-Syndrom (ca. 3% der Fälle) mit Beteiligung von Hirnnerven und insbesondere den äußeren Augenmuskeln.

Im Vordergrund der klinischen Beschwerden stehen akut einsetzende, meist symmetrische Lähmungen, welche distal an den unteren, selten an den oberen Extremitäten beginnen und nach proximal aufsteigen. Ein variables Ausmaß begleitender sensibler Störungen, Myalgien und radikuläre Schmerzen können hinzukommen. Die Affektion der motorischen Nervenfasern führt zu einer deutlichen Abschwächung oder gar zum Ausfall von Muskeleigenreflexen sowie im weiteren Verlauf zu einer Atrophie betroffener Muskeln. Die Symptomatik schreitet rasch fort und erreicht in 80% der Fälle innerhalb von 2 Wochen ihren Höhepunkt (Grisold et al. 1991), welcher in schweren Fällen durch eine komplette Lähmung aller 4 Extremitäten (Tetraplegie) gekennzeichnet ist. Eine Beteiligung der Spinalwurzel C4 kann durch den Ausfall der Zwerchfellmuskulatur zu einer Atemlähmung führen. Bis zu 30% der Patienten müssen passager mechanisch beatmet werden (Teitelbaum und Borel 1994). Bei Befall vegetativer Nerven besteht im Rahmen des sogenannten Dysautonomie-Syndroms zudem die Gefahr von Herzrhythmusstörungen (Greenland und Griggs 1980).

Im Bereich entzündeter Nervenwurzeln, welche innerhalb des Liquorraums liegen, kann vermehrt Protein in den Liquor übertreten. Eine deutliche Erhöhung der Proteinkonzentration im Liquor ( $> 100 \text{ mg/dl}$ ) bei annähernd normaler Zellzahl ( $< 10 \text{ Zellen/mm}^3$ ) wird als zytoalbuminäre Dissoziation bezeichnet und ist ein für das GBS typischer Befund. Elektrophysiologisch kann eine Verlangsamung der NLG als Ausdruck einer Demyelinisierung beobachtet werden. Als diagnostisch wegweisender elektrophysiologischer Befund für das demyelinisierende GBS gilt der Verlust der sogenannten F-Wellen, welcher als proximaler Leitungsblock aufgrund axonaler Dysfunktion interpretiert wird (Yokota et al. 1996; Kuwabara et al. 2000). Eine Amplitudenminderung abgeleiteter Summenaktionspotenziale im Elektromyogramm (EMG) tritt nur bei axonalen Formen auf. Nervenbiopsien aus GBS-Patienten zeigen eine entzündliche Infiltration des PNS mit T-Lymphozyten und Makrophagen (Pollard et al. 1987; Schmidt et al. 1996; Fujioka et al. 2000). Histomorphologische Zeichen einer Demyelinisierung sind im überwiegenden Teil der Fälle nachweisbar, in etwa 30% sind auch histologische Zeichen axonaler Degeneration zu finden (Hughes et al. 1992; Guo et al. 1997). Obwohl das GBS an sich selbstlimitierend verläuft, profitieren viele Patienten von einer immunmodulatorischen Therapie. Die intravenöse Gabe von Immunglobulinen und Plasmaaustausch werden dabei als gleichwertig betrachtet und bewirken, besonders bei rechtzeitigem Therapiebeginn innerhalb von 2 Wochen nach Krankheitsausbruch, eine deutliche Verkürzung der mehrmonatigen Regenerationsphase (Czaplinski und Steck 2004). Trotzdem behalten bis zu 20% der Patienten bleibende Behinderungen zurück. Todesfälle (2 – 5% der Fälle) treten meist bei

schwerst betroffenen Patienten durch respiratorische Komplikationen oder autonome Dysregulation im Rahmen ihrer intensivstationären Behandlung auf.

### 2.1.2 Pathogenetisch relevante Faktoren inflammatorischer Neuropathien

Die Pathogenese der inflammatorischen Neuropathien ist oft nicht eindeutig zu klären. In bis zu 70% der Fälle tritt das GBS 2 bis 3 Wochen nach einem Infekt, meist der oberen Atemwege oder des Magendarmtraktes, auf (Yuan et al. 2002). So können bei GBS-Patienten gehäuft Infektionen mit *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*, ca. 30%), *Zytomegalievirus* (CMV, von engl. *cytomegaly virus*, bis zu 15%) oder *Epstein-Barr-Virus* (EBV, ca. 10%) im Vorfeld der Erkrankung nachgewiesen werden (Jacobs et al. 1998; Van der Meché et al. 2001). Patienten mit GBS nach vorangegangener *C.-jejuni*-Infektion fallen im Vergleich mit Patienten ohne vorherige Infektion durch eine besonders schwere, überwiegend motorische Symptomatik, eine protrahierte Regenerationsphase sowie ein erhöhtes Ausmaß an Residualschäden auf und zeigen ausgeprägte Axondegenerationen in betroffenen peripheren Nerven (Rees et al. 1995; Visser et al. 1995; Hughes und Rees 1997). Eine dem GBS vorausgehende CMV-Infektion scheint dagegen mit primär sensiblen Ausfällen, vermehrter Hirnnervenbeteiligung sowie einer Häufung respiratorischer Komplikationen assoziiert zu sein (Visser et al. 1996). Zudem können im Serum von Patienten mit axonalem GBS oft Antikörper gegen die Ganglioside GM1, GD1a, GalNac-GD1a und GD1b nachgewiesen werden, welche in humanen peripheren Nerven als Bestandteile der Myelinscheiden und Axonmembranen vorkommen (Yuki et al. 1990; Kusunoki et al. 1994; Lugaresi et al. 1997; Ho et al. 1999). GM1, GD1a und GD1b weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit Oligosaccharidmustern von Lipopoly- und Lipooligosacchariden auf, welche in der Zellwand von aus GBS-Patienten isolierten *C.-jejuni*-Stämmen zu finden sind (Yuki et al. 1993; Aspinall et al. 1994; Guerry et al. 2002). Die daraufhin aufgestellte Hypothese, dass molekulares Mimikry und die Bildung kreuzreagierender Antikörper einen wesentlichen pathogenetischen Faktor bei der Entstehung der axonalen Formen des GBS darstellen (Yuki 2001), wurde experimentell durch Immunisierung von Kaninchen mit GM1-ähnlichen Lipooligosacchariden bestätigt, welche in der Folge Paresen entwickelten (Yuki et al. 2004). Als wichtiges pathophysiologisches Merkmal der demyelinisierenden Formen des GBS wird die Infiltration des PNS mit T-Lymphozyten und Makrophagen angesehen, in deren Folge es zu lokalen Demyelinisierungsprozessen kommt, an denen Makrophagen nachweislich aktiv beteiligt sind (Griffin et al. 1993; Kiefer et al. 2001). Zudem lassen sich nur bei einem

geringen Anteil der Patienten mit demyelinisierendem GBS myelinspezifische Antikörper im Serum nachweisen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass sich die Autoreaktivität nicht unmittelbar gegen Myelinbestandteile richtet oder auf einer primär zellulären Immunantwort basiert, für welche Antikörper eine eher untergeordnete Rolle spielen. Dennoch lässt sich durch Immunisierung mit Myelinkomponenten im Tiermodell eine gegen das PNS gerichtete Immunantwort auslösen, welche in den immunisierten Tieren eine sogenannte experimentelle Autoimmunneuritis (EAN) induziert, die in klinischer, elektrophysiologischer und auch pathologischer Hinsicht als ein geeignetes Modell für das akute demyelinisierende GBS angesehen werden kann (Maurer und Gold 2002).

Autoimmunologische Prozesse – sowohl humorale als auch zelluläre Faktoren – sind an der Entstehung des GBS entscheidend beteiligt. Da das Immunsystem in diesem Zusammenhang von zentraler Bedeutung ist, sollen die relevanten immunologischen Mechanismen in den folgenden Abschnitten näher erläutert und anschließend für das PNS im Speziellen dargestellt werden.

### **3 Funktionsweisen des Immunsystems**

Als Reaktion auf eine Infektion des Organismus durch pathogene Keime können im menschlichen Immunsystem zwei verschiedene Antworttypen beobachtet werden. Eine prompte, in ihrer Intensität stereotype Immunantwort erfolgt bereits Stunden nach der Infektion durch das angeborene Immunsystem, die Antwort des sogenannten adaptiven Immunsystems tritt verzögert innerhalb von Tagen ein. Trotz unterschiedlicher Funktionsprinzipien agieren angeborenes und adaptives Immunsystem dabei als eine funktionelle Einheit.

Die Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems, in erster Linie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, eliminieren in den Körper eingedrungene Erreger überwiegend durch Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst anhand einiger konservierter struktureller Muster, welche für viele Pathogene charakteristisch sind, jedoch nicht in gleicher Form auf körpereigenen Zellen vorkommen. Solche molekularen invarianten Strukturen sind z. B. Lipopolysaccharid (LPS, ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien), Peptidoglykan, spezielle Lipoproteinstrukturen oder bakterielle DNA und können mithilfe einer begrenzten Anzahl unterschiedlicher Rezeptoren, sogenannten *Pattern-recognition-Rezeptoren* (engl. für Mustererkennung), von den Abwehrzellen der angeborenen Immunität erkannt werden. In

diesem Zusammenhang spielt die Familie der Toll-like-Rezeptoren (TLR) eine wichtige Rolle. Für den Menschen sind derzeit 11 verschiedene TLR bekannt (Kaisho und Akira 2000; Takeda et al. 2003), die jeweils unterschiedliche pathogen-assoziierte molekulare Strukturen erkennen (Hemmi et al. 2000; Takeuchi et al. 2000; Vabulas et al. 2001; Kariko et al. 2004; Zhang et al. 2004). Dendritische Zellen (DC, von engl. *dendritic cell*) sind ebenfalls mit den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems ausgestattet, nehmen jedoch eine Sonderstellung ein. Ihre eigentliche Hauptfunktion besteht nicht in der Eliminierung von Pathogenen, sondern in der Aktivierung von Zellen des adaptiven Immunsystems durch professionelle Antigenpräsentation. Sie bilden damit die Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem.

Das Funktionsprinzip des adaptiven Immunsystems beruht auf der spezifischen Erkennung von Antigenen durch antigenspezifische Rezeptoren. Träger der adaptiven Immunität sind die Lymphozyten, welche aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle im Knochenmark hervorgehen und folgend zu B-Lymphozyten (von engl. *bone marrow* für Knochenmark), deren weitere Entwicklung im Knochenmark erfolgt, und T-Lymphozyten (von engl. *thymus*) differenzieren, welche in den Thymus auswandern und dort weiter ausreifen. Reife B- und T-Lymphozyten (kurz B- und T-Zellen) durchwandern den Körper und zirkulieren dabei zwischen dem Blutkreislauf und dem Lymphsystem. Sie besitzen auf ihrer Oberfläche spezielle B-Zell- bzw. T-Zell-Rezeptoren (BCR, TCR, von engl. *B-/T-cell receptor*). Diese Rezeptoren sind membrangebundene Multiproteinkomplexe und können über zwischen einzelnen B- bzw. T-Zellen hochvariable Antigenbindungsstellen spezifisch verschiedenste antigene Strukturen, z. B. in Form von Proteinfragmenten, sogenannte antigene Epitope, erkennen (Stanfield und Wilson 1995). Dabei bildet jeder einzelne reife Lymphozyt nur Rezeptormoleküle einer einzigen, ihm eigenen Spezifität, die sich jeweils von den Antigenpezifitäten der Rezeptoren aller anderen Lymphozyten unterscheidet. Ein naiver Lymphozyt ohne bisherigen Kontakt mit seinem spezifischen Antigen wird, wenn er auf dieses trifft, aufgrund einer gezielten Interaktion zwischen Antigen und Rezeptor zur Vermehrung und Differenzierung in eine spezifische Effektorzelle stimuliert. In der Folge bildet sich eine Anzahl von Zellklonen mit identischem Rezeptor, welcher spezifisch das Antigen binden kann. Mit dem breiten Spektrum unterschiedlicher antigenspezifischer Rezeptoren ist das Repertoire reifer Lymphozyten zur Induktion einer adaptiven Immunantwort auf nahezu jegliches denkbare Antigen imstande. Anders als das angeborene Immunsystem ist das adaptive Immunsystem zudem zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses befähigt. Voraussetzung für die Initiation einer adaptiven Immunantwort ist die



Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen, welche nachfolgend genauer geschildert werden soll.

### 3.1 Aktivierung naiver T-Zellen zu spezifischen Effektorzellen

T-Zellen können anhand der Korezeptormoleküle CD4 und CD8 in zwei unterschiedliche Subpopulationen von Effektorzellen unterteilt werden. CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) interagieren über zellgebundene und sezernierte Effektormoleküle gezielt mit weiteren Immunzellen und stimulieren diese. So können T<sub>H</sub>1-Zellen durch die Sekretion von Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) die bakteriziden Eigenschaften von Makrophagen steigern und damit die zelluläre Immunantwort des angeborenen Immunsystems verstärken, während T<sub>H</sub>2-Zellen eine überwiegend humorale Immunantwort induzieren, indem sie vermehrt Interleukin(IL)-4 und IL-5 sezernieren und damit B-Zellen zur Expansion und Differenzierung in antikörpersezernierende Plasmazellen stimulieren (Stout und Bottomly 1989). Auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen treten über ihren TCR in engen Kontakt mit antigenspezifischen Zielzellen. Sie sind zur gerichteten Lyse ihrer Zielzellen fähig, ohne benachbarte Zellen in Mitleidenschaft zu ziehen. Dies beruht auf einer gezielten Freisetzung zytotoxischer Proteine wie Perforin und Granzym B aus lytischen Granula im Zytoplasma der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Poren aus Perforinpolymeren in der Membran der Zielzelle lösen eine rasche Zerstörung derselben durch unkontrollierten Einstrom von extrazellulärer Flüssigkeit als auch von Granzym B aus, welches in der Zielzelle Apoptose induziert (Kagi et al. 1994; Barry et al. 2000). Letztere kann auch ausgelöst werden, indem der sogenannte Fas-Ligand auf aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen an seinen entsprechenden Rezeptor Fas (CD95) auf der Zielzelle bindet und in dieser für den programmierten Zelltod wichtige Proteine, die Caspasen, aktiviert (Ju et al. 1999). Die Differenzierung in Effektorzellen erfordert eine vorherige Aktivierung naiver T-Zellen. Dafür sind im Wesentlichen zwei verschiedene Signale notwendig, welche auf einer spezifischen Wechselwirkung zwischen TCR und Antigen einerseits sowie weiterer, kostimulatorischer Ligand-Rezeptor-Paare andererseits beruhen. Zur simultanen Expression aller für eine effektive T-Zell-Aktivierung notwendigen Faktoren sind nur sogenannte professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) fähig, auf welche die T-Zellen bei ihrer ständigen Zirkulation zwischen Blutkreislauf und Lymphsystem in peripheren Lymphknoten treffen. Dort erfolgt meist die Erstaktivierung naiver T-Zellen durch professionelle APC, zu welchen als wichtigster Vertreter die DC, jedoch auch B-Zellen und Makrophagen zählen. Die komplexen Interaktionen zwischen APC und T-Zelle, welche sowohl das antigenspezifische Signal über

den TCR als auch das kostimulatorische Signal erzeugen, sollen in den nächsten Abschnitten erläutert werden.

### 3.1.1 Das 1. Signal: Die TCR-MHC-Interaktion

Während B-Zellen durch ihre Rezeptoren Antigene aus dem Extrazellulärraum direkt erkennen und binden können, sind T-Zellen dazu nur in der Lage, wenn das Antigen als Oligopeptid im Kontext von spezialisierten Molekülen auf der Oberfläche anderer Zellen präsentiert wird (Davis und Bjorkman 1988). Diese Präsentationsmoleküle sind membrangebundene Glykoproteine, welche im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, von engl. *major histocompatibility complex*), einer Genregion auf Chromosom 6 des menschlichen Genoms, codiert sind und als MHC-Moleküle bezeichnet werden. Es existieren zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen, die sich strukturell ähneln, jedoch unterschiedlich auf Körperzellen exprimiert werden.

MHC-I-Moleküle werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) aller kernhaltigen Körperzellen gebildet und bestehen aus einer langen Polypeptidkette, welche sich aus den drei Domänen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  zusammensetzt und mit ihrem Ende in der Membran des ER verankert ist. Dieser Kette ist ein akzessorisches Protein, das sogenannte  $\beta_2$ -Mikroglobulin, nicht-kovalent angelagert und trägt zur Stabilisierung der Molekülstruktur bei. Die Domänen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  bilden auf der Oberfläche des MHC-I-Moleküls einen Spalt, in dem Oligopeptide mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren jeweils an ihren Enden gebunden werden können (Bouvier und Wiley 1994; Rammensee 1995). MHC-I-Moleküle werden nach intrazellulärer Beladung mit endogenen Peptiden in Form von Membranvesikeln an die Zelloberfläche transportiert (siehe 3.3.1).

MHC-II-Moleküle werden im ER professioneller APC synthetisiert. Sie weisen eine heterodimere Struktur auf, welche aus einer nicht-kovalenten Zusammenlagerung der beiden Domänen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  mit den beiden Domänen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  hervorgeht.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domänen sind jeweils über eine Polypeptidkette mit der ER-Membran verbunden. Strukturen der Domänen  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  bilden auch auf der Oberfläche der MHC-II-Moleküle einen Spalt, dessen Enden jedoch weiter geöffnet sind, als es bei MHC-I-Molekülen der Fall ist. Peptide, welche in dem Spalt auf MHC-II-Molekülen gebunden werden, können eine Länge von 13 oder mehr Aminosäuren aufweisen und sind damit größer als die Peptide auf MHC-I-Molekülen (Rudensky et al. 1991; Rammensee 1995). Sie stammen überwiegend aus der lysosomalen Degradation internalisierter, ursprünglich exogener Proteine (siehe 3.3.2).

Der TCR stellt den Interaktionspartner der MHC-Peptid-Komplexe dar. Er interagiert über die peripheren Anteile seiner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette mit dem antigenen Peptid sowie umgebenden Oberflächenstrukturen des MHC-Moleküls (Teng et al. 1998). Richtet sich die Spezifität des TCR überwiegend gegen das Peptid, spricht man von einer peptiddominierten Bindung. Eine Interaktion, welche hauptsächlich auf der spezifischen Bindung des TCR an bestimmte Struktur motive des MHC-Moleküls beruht, wird als MHC-dominierte Bindung bezeichnet. Letztere bildet die Grundlage peptidunabhängiger Alloreaktivität gegen körperfremde MHC-Moleküle und ist im Zusammenhang mit Abstoßungsreaktionen gegen Allotransplantate von Bedeutung (Smith et al. 1997). Eine MHC-dominierte Bindung an Komplexe aus antigenem Peptid und körpereigenen (Selbst-)MHC-Molekülen würde jedoch zur Autoreaktivität einer T-Zelle mit einer solchen TCR-Spezifität gegenüber körpereigenen Zellen führen. Daher wird in einem strengen Selektionsprozess während der T-Zell-Entwicklung im Thymus eine Selbst-MHC-Toleranz der T-Zellen erzeugt (siehe 3.2). Die TCR-MHC-Interaktion ist nur effektiv, wenn der Korezeptor der T-Zelle (CD4 oder CD8) an dieser Interaktion teilnimmt. Er bindet an einer vom peptidbindenden Spalt entfernten Stelle seitlich an das MHC-Molekül (Gao et al. 1997). T-Zellen mit einem für MHC-II-Peptid-Komplexe spezifischen TCR bilden den Korezeptor CD4, T-Zellen mit einer TCR-Spezifität für Peptide auf MHC-I-Molekülen exprimieren CD8. Diese TCR-MHC-Interaktion bildet das erste und wichtigste Signal für die T-Zell-Aktivierung.

### 3.1.2 Das kostimulatorische Signal

Neben der TCR-MHC-Interaktion kommt es zu weiteren Ligand-Rezeptor-Interaktionen, welche das für eine vollständige T-Zell-Aktivierung notwendige kostimulatorische Signal übermitteln. APC exprimieren auf ihrer Oberfläche unter anderem die beiden kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), kurz B7-Moleküle, welche spezifisch an das CD28-Molekül, ihren Rezeptor auf der T-Zelle binden. Die B7-CD28-Interaktion ist das am besten untersuchte kostimulatorische Signal und essenziell für die T-Zell-Aktivierung (Greenfield et al. 1998; Manickasingham et al. 1998; Coyle und Gutierrez-Ramos 2001; Gonzalo et al. 2001; Sharpe und Freeman 2002). Dieses Signal induziert die Expression des CD40-Liganden (CD40-L, auch CD154) auf der T-Zelle und verstärkt sich dadurch selbst, da die Wechselwirkung von CD40-L mit seinem Rezeptor, dem Oberflächenmolekül CD40 auf der APC, zum einen der T-Zelle weitere Aktivierungssignale übermitteln und zum anderen die Expression von B7-Molekülen durch die APC steigert

(Grewal und Flavell 1996). In der T-Zelle wird eine komplexe intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, welche über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (von engl. *nuclear factor of activated T-cells*) die Transkription des IL-2-Gens induziert (Jain et al. 1995). Die CD28-Kostimulation bewirkt offensichtlich über eine Stabilisierung der Zytokin-mRNA, welche unter normalen Umständen aufgrund bestimmter instabilisierender Sequenzen schnell abgebaut wird (Brown et al. 1996), sowie über eine Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren eine starke Erhöhung der IL-2-Synthese. Zudem führt sie zur Expression eines hochaffinen Rezeptors für IL-2 in T-Zellen (Cerdan et al. 1995). Das Zytokin IL-2 ist ein autokriner T-Zell-Wachstumsfaktor und löst nach Bindung an seinen Rezeptor eine starke Proliferation (klonale Expansion) sowie eine Differenzierung der aktivierten T-Zelle in eine Effektorzelle aus (Minami et al. 1993). So entsteht eine Anzahl identischer Klone differenzierter T-Effektorzellen, welche zur Ausübung ihrer Funktionen keine Kostimulation mehr benötigen. Nach erfolgreicher Eliminierung eines Pathogens im Rahmen einer adaptiven Immunantwort fehlt durch die Abwesenheit des spezifischen Antigens der adäquate Stimulus für die antigenspezifischen T-Effektorzellen, die dann größtenteils aufgrund von „Vernachlässigung“ durch Apoptose zugrunde gehen. Einige dieser T-Effektorzellen entwickeln sich jedoch zu langlebigen T-Gedächtniszellen, welche bei erneutem Kontakt mit einem ihnen bekannten Antigen eine schnellere und effizientere Immunantwort induzieren können. Wichtig ist, dass nur solche APC, wie z. B. mature DC, welche über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems die Anwesenheit von Erregern detektiert haben und damit selbst aktiviert wurden, B7-Moleküle exprimieren und somit naive T-Zellen aktivieren können. Dies ist für die Aufrechterhaltung der peripheren Selbst-Toleranz potenziell autoreaktiver T-Zellen von Bedeutung (siehe 3.2).

### **3.2 Entstehung der Selbst-Toleranz und Autoreaktivität von T-Zellen**

Die umfangreiche Biodiversität des TCR entsteht während der Entwicklung unreifer T-Zellen im Thymus primär durch eine zufällige, chaotische Umordnung einzelner, die verschiedenen Abschnitte des TCR-Moleküls codierender Gene, für welche in sich entwickelnden T-Zellen zunächst jeweils zahlreiche Varianten existieren (Rowen et al. 1996). Die nach Abschluss der T-Zell-Entwicklung irreversible Zusammenfügung einzelner Gensegmente zu einem vollständigen TCR-Gen führt dazu, dass eine reife T-Zelle nur noch Tochterzellen mit identischem TCR hervorbringen kann. Diese auf dem Zufallsprinzip beruhende sogenannte somatische Rekombination der TCR-Gene allein würde jedoch die mögliche Heranreifung

von T-Zellen mit TCR beinhalten, welche entweder zu keiner effizienten Interaktion mit MHC-Peptid-Komplexen fähig oder für körpereigene (Selbst-)Peptide spezifisch sind und durch Autoreaktivität den eigenen Organismus schädigen könnten (Chao et al. 2005). Daher wird die somatische Rekombination von einem zweistufigen Selektionsmechanismus begleitet, den unreife T-Zellen während ihrer Entwicklung im Thymus durchlaufen. Naive, zunächst doppelt negative ( $CD4^-CD8^-$ ) T-Zellen beginnen im Thymus nach partieller Umlagerung der TCR-Gene mit der simultanen Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 (Petrie et al. 1990). Diese doppelt positiven ( $CD4^+CD8^+$ ) T-Zellen interagieren im Thymusstroma mit nicht-lymphatischen Stromazellen des Thymus, den sogenannten Thymusepithelzellen, sowie professionellen APC aus dem Knochenmark, welche auf ihrer Oberfläche große Mengen von ubiquitär im Körper vorkommenden, intrazellulären Selbst-Peptiden auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen präsentieren. Während dieser Wechselwirkung vollenden die T-Zellen die Entwicklung ihrer TCR und stellen abhängig von der Klasse des jeweiligen MHC-Moleküls, mit dem sie interagieren, die Expression eines der beiden Korezeptoren ein, so dass einfach positive ( $CD4^+CD8^-$  und  $CD4^-CD8^+$ ) T-Zellen entstehen (von Boehmer et al. 1989). Thymusepithelzellen übermitteln an T-Zellen, deren TCR schwach an Selbst-MHC-Selbst-Peptid-Komplexe bindet, Überlebenssignale zur weiteren Ausreifung und sorgen so für die positive Selektion von T-Zellen, welche Peptide auf Selbst-MHC-Molekülen zwar erkennen können, jedoch keine potenziell schädliche Autoreaktivität gegen Selbst-MHC-Moleküle aufweisen (Fowlkes und Schweighoffer 1995; Ernst et al. 1996). Die negative Selektion von T-Zellen mit stark auf Selbst-Peptide reagierendem TCR erfolgt überwiegend durch DC aus dem Knochenmark (Matzinger und Guerder 1989). Die Präsentation zahlreicher intrazellulärer Selbst-Peptide trägt neben der Eliminierung autoreaktiver Zellen zur Ausbildung eines TCR-Repertoires mit der Potenz zur späteren Erkennung eines breiten Spektrums möglicher Fremd-Peptide bei (Nikolic-Zugic und Bevan 1990; Ashton-Rickardt et al. 1993; Arstila et al. 1999; Goldrath und Bevan 1999). Positive und negative Selektion erzeugen so ein Repertoire an murenen T-Zellen, deren TCR zur Erkennung MHC-restringierter (Fremd-)Peptide bei gleichzeitiger Selbst-MHC-Toleranz fähig sind. Nur ca. 3% der Thymozyten gelangen als reife T-Zellen in die Peripherie, während die restlichen 97% während der Interaktion mit Thymusepithelzellen und APC Apoptosesignale empfangen und so bereits im Thymus durch klonale Deletion eliminiert werden (Shortman et al. 1990; Surh und Sprent 1994).

Einzelne autoreaktive T-Zellen können jedoch der Eliminierung durch negative Selektion entgehen. Dies kommt unter anderem dadurch zustande, dass einige Proteine aus dem

körpereigenen Proteinpool nur in spezialisierten Zellen peripherer Gewebe gebildet und daher möglicherweise nicht von Thymusepithelzellen oder APC im Thymus präsentiert werden. Somit kann keine effiziente negative Selektion unreifer T-Zellen auf solche Peptide erfolgen. Es muss also gewisse Faktoren geben, durch welche diese autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie kontrolliert werden. Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen), auch als T-Suppressorzellen bezeichnet, bilden eine Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und sind zur Supprimierung aktivierter T-Zellen fähig. Natürlich vorkommende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen exprimieren den Forkhead-Transkriptionsfaktor Foxp3, welcher für die Ausbildung der regulatorischen Funktionen der Treg-Zellen essenziell ist (Ohkura und Sakaguchi ; Fontenot et al. 2003; Yagi et al. 2004). Zudem werden verbliebene autoreaktive T-Zellen in einem anergen bzw. ignoranten Zustand toleriert (Parish und Heath 2008). Anergie entsteht, wenn autoreaktive Zellen zwar auf das zu ihrem TCR passende (Selbst-)Antigen treffen, jedoch keine Kostimulation erfahren. Sie verlieren damit gänzlich die Fähigkeit, durch Erkennung ihres spezifischen Antigens jemals wieder aktiviert zu werden. Daran sind vor allem immature DC beteiligt, welche intrazelluläres Material apoptotischer Körperzellen aufnehmen und auf MHC-I- sowie MHC-II-Molekülen naiven T-Zellen präsentieren, ohne gleichzeitig kostimulatorische Moleküle zu exprimieren. Sie tragen damit insbesondere zur Kontrolle von autoreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei (Luckashenak et al. 2008). Zu relevanten autoreaktiven Prozessen kommt es demnach eher selten.

### 3.3 Prozessierung und Präsentation von Antigen

Über den Mechanismus der Antigenpräsentation stehen Immunzellen und andere Körperzellen in ständiger Verbindung. Sie spielt für die T-Zell-Entwicklung im Thymus eine entscheidende Rolle und bildet, wie oben beschrieben, die unverzichtbare Grundlage für die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen und damit die Initiation adaptiver Immunantworten. Voraussetzung für die Antigenpräsentation ist einerseits die Synthese von MHC-Molekülen, andererseits aber auch die Entstehung antigenen Epitope – meist sind dies Proteinfragmente – durch bestimmte intrazelluläre Mechanismen, ein Vorgang, der als Antigenprozessierung bezeichnet wird. Zuletzt müssen diese antigenen Epitope an die MHC-Moleküle gebunden und auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

### 3.3.1 Proteasomale Prozessierung und Präsentation auf MHC-I-Molekülen

Antigene, die auf MHC-I-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden, sind größtenteils intrazellulären Ursprungs und gehen überwiegend als Abbauprodukte aus der Degradation endogener Proteine im Ubiquitin-Proteasom-System hervor (Gaczynska et al. 1993). Das Proteasom, eine ATP-abhängige multikatalytische Protease, setzt sich aus mehreren, proteolytisch aktiven Untereinheiten zu einer zylindrischen Struktur zusammen und befindet sich im Zytosol der Zellen. Gealterte, fehlgefaltete, funktionslose und sonstige Proteine aus dem Arsenal der Zelle werden hier nach Markierung mit Ubiquitin zu Oligopeptiden oder Aminosäuren abgebaut. In virusinfizierten oder tumorösen Zellen kommt es demnach auch zur Degradation zellfremder bzw. pathologischer Proteine.

Für die Präsentation auf MHC-I-Molekülen sind Peptide mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren erforderlich. Diese entstehen entweder direkt durch die proteasomale Proteolyse (Niedermann et al. 1999) oder durch zusätzliche post-proteasomale Prozessierung (York et al. 1999; Rock et al. 2004). Peptide passender Länge werden spezifisch durch das Transportprotein *Transporter associated with antigen processing* (engl., kurz TAP), bestehend aus den Molekülen TAP1 und TAP2, vom Zytosol in das Lumen des ER transloziert (Heemels und Ploegh 1995; Howard 1995). Im ER werden neu synthetisierte MHC-I- $\alpha$ -Ketten mithilfe des Proteins *Calnexin* mit dem akzessorischen  $\beta_2$ -Mikroglobulin zu einem dimeren Komplex zusammengelagert. Dieser löst sich als partiell gefaltetes, unbeladenes MHC-I-Molekül von *Calnexin* und wird unter Beteiligung der ebenfalls im ER lokalisierten Chaperonproteine *Calreticulin* und *ER protein 57* (kurz ERp57, eine Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase) über das TAP-assoziierte Protein *Tapasin* direkt an die TAP-Moleküle angelagert (Pamer und Cresswell 1998; Cresswell et al. 2005). Während dieser Interaktion erfolgt die Bindung des antigenen Peptids an das MHC-I-Molekül sowie dessen endgültige Faltung. Erst durch Beladung mit einem Epitop entsteht ein stabiler MHC-Antigen-Komplex, welcher an die Zelloberfläche transportiert werden kann.

Interessant ist, dass die proteasomale katalytische Aktivität durch Variation der Zusammensetzung des Proteasoms modulierbar ist. Als homologe Gegenstücke für die konstitutiven proteasomalen Untereinheiten MB1 (X), Delta (Y) und Z wurden drei Untereinheiten mit modifizierter proteolytischer Aktivität identifiziert, welche als *Low molecular mass proteins* LMP2, LMP7 und LMP10 (auch *multicatalytic endopeptidase complex-like subunit-1*, kurz MECL-1) bezeichnet werden. Diese sind durch IFN- $\gamma$  induzierbar und können anstelle ihrer entsprechenden konstitutiven Untereinheiten in die

Struktur des Proteasoms integriert werden (Griffin et al. 1998; Bose et al. 2001). Dieser Austausch führt zur Ausbildung eines sogenannten Immunoproteasoms mit veränderter Spezifität. Dadurch gehen aus der proteasomalen Prozessierung vermehrt Peptide hervor, welche für die Präsentation auf MHC-I-Molekülen geeignet sind (Belich und Trowsdale 1995). Durch die extrazelluläre Repräsentation des intrazellulären Antigengehaltes ermöglicht die MHC-I-Präsentation die Detektion von virusinfizierten und entarteten Zellen durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche das Fremdanigen auf der Zelloberfläche erkennen und nachfolgend in der Zielzelle Apoptosesignale induzieren können.

### 3.3.2 Lysosomale Prozessierung und Präsentation auf MHC-II-Molekülen

Die Präsentation von Antigen auf MHC-II-Molekülen ist eine Funktion fast ausschließlich der professionellen APC. Die antigenen Epitope stammen in diesem Fall meist von exogenem Protein, welches von den APC internalisiert und prozessiert wird. Antigenprozessierung und Bindung von Antigen an MHC-II-Moleküle erfolgen in APC in einem spezialisierten, endolysosomalen Zellkompartiment, welches ein multivesikuläres kommunizierendes System bildet (Harding 1995; Harding 1996; Watts 1997). Nach Aufnahme von Antigen durch rezeptorgesteuerte Endozytose oder Makropinozytose (lösliches Antigen) fusionieren die antigenhaltigen Membranvesikel zunächst mit Lysosomen. In diesen wird durch die Aktivität einer Protonenpumpe ein saures Milieu aufrecht erhalten, welches die Hydrolyse von Proteinen durch lysosomale Enzyme erleichtert. Durch den Proteinabbau kommt es zur Bildung von Peptidstrukturen, welche zur Präsentation auf MHC-II-Molekülen geeignet sind. Die Synthese von MHC-II-Molekülen erfolgt wie die der MHC-I-Moleküle im ER sowie anschließend im Golgi-Apparat. Die Bindung an ein akzessorisches Protein, welches als *Invariante Kette* bezeichnet wird, trägt zur Stabilisierung der Molekülstruktur sowie zur Steuerung des vesikulären intrazellulären Transports der MHC-II-Moleküle zu den antigenhaltigen Lysosomen bei (Hiltbold und Roche 2002). In den Lysosomen kommt es zum Kontakt der MHC-II-Moleküle mit den antigenen Peptiden. Nach Dissoziation der *Invarianten Kette*, welche mit dem sogenannten CLIP-Fragment (von engl. *class-II-associated invariant chain peptide*) zuvor den peptidbindenden Spalt blockiert hat, kann das MHC-II-Molekül mit Antigen beladen werden und bildet dann einen stabilen Komplex (Robbins et al. 1996). Die MHC-II-Peptid-Komplexe akkumulieren in Form von Endosomen, welche in aktivierten APC auch B7-Moleküle enthalten und an die Zelloberfläche transportiert werden. Die auch nach Integration der Endosomen in die Zellmembran



weiterbestehende lokale Dichte von MHC-Molekülen und benachbarten kostimulatorischen Molekülen an der Oberfläche der APC erleichtert die Interaktion der zur T-Zell-Aktivierung notwendigen Ligand-Rezeptor-Paare (Turley et al. 2000).

Durch Präsentation vorwiegend exogenen Antigens auf MHC-II-Molekülen geben APC CD4<sup>+</sup> T-Zellen Informationen über die antigene Beschaffenheit ihrer Umgebung. Damit sind sie unverzichtbare Initiatoren spezifischer Immunantworten zur Eliminierung extrazellulärer Pathogene.

### 3.3.3 Überschneidungen beider Antigenprozessierungspfade

Wie oben beschrieben ist die Antigenprozessierung ein komplexer Vorgang, welcher hauptsächlich über zwei Wege, den proteasomalen und den lysosomalen Pfad, abläuft. Dabei werden antigene Peptide, welche aus dem proteasomalen Pfad hervorgegangen sind, vornehmlich auf MHC-I-Molekülen, durch lysosomale Prozessierung entstandene antigene Epitope dagegen überwiegend auf MHC-II-Molekülen präsentiert. Damit handelt es sich um zwei Mechanismen, welche traditionell als streng getrennt angesehen wurden. Allerdings konnten in verschiedenen experimentellen Untersuchungen Abweichungen von diesen zwei separaten Wegen beobachtet werden. Exogenes, internalisiertes Antigen kann offensichtlich auch in den MHC-I-gekoppelten Prozessierungspfad eingeschleust werden. Dies zeigt der Nachweis antigenen Epitope extrazellulärer Herkunft auf MHC-I-Molekülen (Pfeifer et al. 1993). So wurde in Experimenten beobachtet, dass von DC internalisiertes, exogenes Antigen über spezielle Transportsysteme von den Endosomen in das Zytoplasma gelangt, wo es zur Präsentation auf MHC-I-Molekülen der proteasomalen Degradation zugeführt wird (Guermontprez und Amigorena 2005; Imai et al. 2005). Zudem ist durch Fusion antigenhaltiger Phagosomen mit Membranen des ER eine Einschleusung exogenen Antigens in den MHC-I-gekoppelten Pfad möglich (Ackerman und Cresswell 2004; Wan et al. 2005). Neueste Erkenntnisse gehen auch von einem eigenständigen Pfad aus, in welchem die Antigenprozessierung und Bindung von ursprünglich extrazellulären Peptiden an MHC-I-Moleküle in einem endosomalen Zellkompartiment erfolgt (Lizee et al. 2003; Burgdorf et al. 2008; Di Pucchio et al. 2008), im Gegensatz zur normalen MHC-I-Beladung, welche im ER stattfindet.

Ebenso wurde umgekehrt demonstriert, dass endogen synthetisiertes Antigen auch auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden kann (Weiss und Bogen 1991; Malnati et al. 1992; Dani et al. 2004). In diesem Fall scheint an der Prozessierung, wie auch im MHC-I-gekoppelten Pfad,

zunächst die proteasomale Proteolyse entscheidend beteiligt zu sein. Durch Translokation entstehender Peptide in Lysosomen über wenig bekannte Mechanismen gelangt das Antigen in den MHC-II-Prozessierungspfad (Lich et al. 2000; Li et al. 2005). Autophagie ist ein weiterer Prozess, welcher über die Bereitstellung überalterter zytosolischer Zellbestandteile und Organellen für die lysosomale Degradation den Zugang intrazellulären Materials zum MHC-II-gekoppelten Prozessierungspfad ermöglicht (Deretic 2006; Munz 2009). Intrazelluläre und extrazelluläre Antigene können somit auf verschiedenen, jedoch sich überschneidenden Wegen in beide Pfade der Antigenprozessierung gelangen. Über diesen Mechanismus, welcher auch als Kreuzpräsentation bezeichnet wird, kann, unabhängig von der Herkunft eines Antigens, sowohl eine zytotoxische, durch CD8<sup>+</sup>-Zellen vermittelte als auch eine über CD4<sup>+</sup>-Zellen gesteuerte Immunantwort induziert werden. Zudem wird durch die Präsentation ursprünglich extrazellulären Materials, z. B. aus apoptotischen Zellen oder Gewebeantigene, welche von DC internalisiert wurden, auf MHC-I-Molekülen die sogenannte Kreuztoleranz von CD8<sup>+</sup> T-Zellen hervorgerufen (Luckashenak et al. 2008).

#### **4 Induktion lokaler immunologischer Prozesse im PNS**

Die oben geschilderten immunologischen Mechanismen können auch für Erkrankungen des PNS pathophysiologisch relevant werden, wenn Immunzellen im Rahmen des Krankheitsprozesses vermehrt in direkten Kontakt mit peripherem Nervengewebe kommen. Durch *Tight Junctions* miteinander verbundene endoneurale mikrovaskuläre Endothelzellen sowie Perizyten bilden das morphologische Korrelat der sogenannten Blut-Nerven-Schranke (BNS), welche als anatomische und funktionelle Barriere das PNS von der systemischen Blutzirkulation trennt und durch geregelten Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten Nervengewebe und Blut die PNS-Homöostase aufrecht erhält (Sano et al. 2007; Shimizu et al. 2008; Kanda 2009). Die Diffusion von Stoffen vom Epineurium in das Endoneurium wird zudem durch das wenig permeable Perineurium eingeschränkt (Kiernan 1996). Jedoch ist die Barrierefunktion der BNS nicht absolut und an einigen Stellen – wie etwa den motorischen Endplatten, an Ganglien oder den Nervenwurzeln – auch anatomisch nicht vollständig ausgebildet (Kiernan 1996). Im Rahmen inflammatorischer Neuropathien kommt es zu einer pathologischen Permeabilitätssteigerung der BNS, welche systemischen Antikörpern und Immunzellen lokalen Zugang zum peripheren Nervengewebe verschafft und sowohl die Induktion als auch das Fortbestehen entzündlicher Prozesse im PNS begünstigt. Als Zeichen

der BNS-Dysregulation kann eine verminderte Synthese bzw. veränderte Lokalisation der *Tight-Junction*-Proteine Claudin-5 und ZO-1 (von lat. *Zonula occludens*) beobachtet werden (Kanda et al. 2004). Insbesondere aktivierte Immunzellen können scheinbar durch direkte Wirkung auf BNS-Gewebe die Lösung interzellulärer *Tight Junctions* induzieren und vermehrt sowohl para- als auch transzellulär die endoneurale Endothelbarriere überwinden (Pollard et al. 1995). Auch humorale Faktoren wie Antikörper und von aktivierten T-Zellen sezernierte Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sind möglicherweise an der Entstehung der BNS-Schädigung beteiligt (Lilje und Armati 1999; Kanda et al. 2003).

Im Falle von inflammatorischen Neuropathien spielen speziell autoreaktive T-Zellen eine besondere Rolle. Trotz der oben genannten Kontrolle durch regulatorische T-Zellen und DC kann es zur Reaktivierung verbliebener autoreaktiver T-Zellen kommen. Trigger einer solchen Reaktivierung sind häufig unspezifische Reize, wie etwa eine Infektion oder eine Impfung, in deren Gefolge die Wahrscheinlichkeit steigt, dass autoreaktive Zellen auf aktivierte APC treffen. Da aktivierte, d. h. kostimulatorische Moleküle tragende APC neben internalisiertem Antigen auch Selbst-Peptide auf MHC-I-Molekülen präsentieren, kann hier die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen mit einem für diese Selbst-Peptide spezifischen TCR erfolgen. Die reaktivierten Zellen können in der Folge vermehrt über die BNS ins periphere Nervengewebe übertreten und lokal akkumulieren. Kommt es dort zur Erkennung ihres spezifischen Antigens, können diese Zellen eine lokale adaptive Immunantwort induzieren.

An der Entstehung des Nervenschadens beim GBS sind Makrophagen, als die dominierende Zellpopulation im entzündeten endoneuralen Nervengewebe, entscheidend beteiligt. Sie können in komplement- oder antikörperabhängiger Weise aktiv zur Zerstörung und Phagozytose von Myelinscheiden und Schwann-Zellen sowie durch Sekretion toxischer Mediatoren auch zur Destruktion von primär nicht beteiligtem, umgebendem Gewebe beitragen (Griffin et al. 1993; Kiefer et al. 1998; Kiefer et al. 2001). Zudem steuern sie über die Sekretion proinflammatorischer (IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$ ) sowie später auch antiinflammatorischer Zytokine (Transforming growth factor(TGF)- $\beta$  und IL-10) die Regulation und auch die Terminierung des lokalen Entzündungsprozesses (Griffin et al. 1993; Kiefer et al. 2001). Dabei können Makrophagen als wichtige lokale APC einerseits selbst durch aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen im PNS stimuliert werden und andererseits mittels Antigenpräsentation destruktive Prozesse durch autoreaktive T-Zellen weiter unterhalten. Autoreaktive zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen können eine direkte Zerstörung von Zellen des peripheren Nervengewebes verursachen. Autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen können dagegen B-Zellen zur Antikörperbildung anregen und damit die oben erwähnte antikörperabhängige

zelluläre Zytotoxizität durch Makrophagen verstärken. Der Nachweis von sowohl CD8<sup>+</sup> als auch CD4<sup>+</sup> T-Zell-Infiltraten im PNS von GBS-Patienten legt nahe, dass neben Makrophagen auch diese Ansammlungen autoreaktiver Zellen einen wesentlichen Faktor im Entzündungsprozess dieser Erkrankung darstellen und vermutlich ein Fortschreiten der Schädigung peripherer Nerven vor Ort perpetuieren können (Pollard et al. 1987; Schmidt et al. 1996; Fujioka et al. 2000).

#### 4.1 Schwann-Zellen in entzündlich veränderter Umgebung

Das Beispiel der inflammatorischen Neuropathien zeigt, dass Schwann-Zellen als die umhüllenden Zellen peripherer Nervenfasern zu Zielstrukturen von Immunreaktionen werden können. Dies kann auf der Bildung kreuzreagierender Antikörper beruhen, welche über die Bindung an Strukturen auf der Schwann-Zell-Oberfläche eine Zerstörung der Schwann-Zellen durch weitere Immunzellen, insbesondere Makrophagen, hervorrufen können. In neuester Zeit ergaben sich jedoch zunehmend Hinweise, dass auch Schwann-Zellen, neben ihrer Hauptfunktion, welche in der Myelinisierung von Nervenfasern besteht (siehe 1.1.1), wichtige immunmodulatorische Eigenschaften besitzen (Meyer zu Horste et al. 2008). In diesem Zusammenhang bedeutsam ist die auf Schwann-Zellen nachgewiesene Expression von Toll-like-Rezeptoren (Oliveira et al. 2003), welche wichtige Moleküle auf APC, wie z. B. DC, darstellen (siehe 3). Die Stimulation dieser Rezeptoren durch nekrotisches Zellmaterial (TLR-2, TLR-3) oder Bakterienbestandteile wie LPS (TLR-4) führt offensichtlich zu einer Aktivierung der Schwann-Zellen und induziert in ihnen die Expression verschiedener immunmodulatorischer Faktoren (Lee et al. 2006). So können Schwann-Zellen über die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine bzw. Chemokine TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) Makrophagen anlocken und die Initiierung einer lokalen Entzündung im PNS auslösen (Bergsteinsdottir et al. 1991; Gadiant und Otten 1996; Murwani et al. 1996; Wagner und Myers 1996; Tofaris et al. 2002). Durch eine gleichzeitige, unter inflammatorischen Stimuli vermehrt nachgewiesene Expression bestimmter Zytokinrezeptoren (z. B. für TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1) können Schwann-Zellen zudem selbst auf freigesetzte Zytokine reagieren und die Zytokinsynthese (wie für IL-1 nachgewiesen) zum Teil in auto- bzw. parakriner Weise regulieren (Skundric et al. 1997; Bonetti et al. 2000; Oliveira et al. 2005). Durch die oben genannten Mechanismen sind Schwann-Zellen über zelluläre und auch humorale Faktoren in der Lage, eine lokale Immunantwort im PNS zu initiieren und zu regulieren. Unter dem synergistischen Einfluss

von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  wird desweiteren die Expression des Fas-Liganden (Fas-L) sowie der sogenannten induzierbaren NO-Synthase (iNOS, NO von engl. *nitric oxide*) durch Schwann-Zellen induziert. Die Interaktion des Fas-L mit Fas-Rezeptoren auf T-Zellen sowie die vermehrte Freisetzung von NO und dessen toxischen Metaboliten aus Schwann-Zellen sind möglicherweise Mechanismen, über welche Schwann-Zellen autoreaktive T-Zellen im PNS eliminieren und zur Terminierung einer lokalen Immunantwort beitragen können (Wohlleben et al. 2000). Schwann-Zellen sind also offensichtlich aktiv an der Regulation lokaler Immunreaktionen beteiligt. Dabei stellt sich, auch angesichts des oben beschriebenen Nachweises von autoreaktiven spezifischen Zellproliferaten in Biopsien aus entzündeten peripheren Nerven, die Frage, ob neben einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch professionelle APC auch eine lokale Antigenpräsentation durch Schwann-Zellen für die Stimulation autoreaktiver T-Zellen und damit für die Pathogenese inflammatorischer Neuropathien eine Rolle spielen kann. Der Nachweis der kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und BB-1 auf nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen sowie der gesteigerten BB-1-Expression durch myelinisierende Schwann-Zellen aus Nervenbiopsien von CIDP-Patienten legt bereits eine mögliche Funktion der Schwann-Zellen als APC in inflammierter Umgebung nahe (Murata und Dalakas 2000; Spierings et al. 2001; Pollard 2002). Die Untersuchung der Schwann-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation ist somit in diesem Zusammenhang von größtem Interesse und ermöglicht tiefere Einsichten in die Pathomechanismen inflammatorischer Neuropathien.

#### **4.1.1 Expression von MHC-Molekülen auf Schwann-Zellen**

Während MHC-I-Moleküle auf jeder kernhaltigen Körperzelle nachweisbar sind, werden MHC-II-Moleküle unter normalen Umständen nur von professionellen APC exprimiert, welche somit T-Lymphozyten, speziell CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren können. So sind neben den DC auch Makrophagen und B-Zellen zur professionellen Antigenpräsentation fähig. Abgesehen davon gibt es aber auch andere Zellen, die unter bestimmten Umständen zur Expression von MHC-II-Molekülen angeregt werden können. Anhand von Zellkulturexperimenten mit Myoblasten und Muskelbiopsien von Patienten mit entzündlichen Muskelerkrankungen konnte nachgewiesen werden, dass auch Myozyten unter inflammatorischen Stimuli zur Synthese von MHC-II-Molekülen in der Lage sind (Wiendl et al. 2003). Auch in Schwann-Zellen, welche unter normalen Umständen eine basale Menge an MHC-I-Molekülen, jedoch keine MHC-II-Moleküle bilden, kann die Synthese beider Klassen

von MHC-Molekülen induziert werden, wie *in-vitro*-Experimente an Ratten-Schwann-Zellen (Samuel et al. 1987; Anselin und Pollard 1990; Armati et al. 1990; Argall et al. 1991; Lilje und Armati 1997) sowie an humanen Schwann-Zellen (Armati et al. 1990) zeigen konnten. Unter Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IFN- $\gamma$  sowie dem synergistisch wirkenden TNF- $\alpha$ , die beide unter anderem von aktivierten T-Zellen und Makrophagen sezerniert werden, kann eine deutlich gesteigerte MHC-II-Expression der Schwann-Zellen beobachtet werden (Samuel et al. 1987; Kingston et al. 1989; Anselin und Pollard 1990; Tsai et al. 1991; Bergsteinsdottir et al. 1992; Lisak und Bealmear 1992; Gold et al. 1995; Tsuyuki et al. 1998). Dies gibt Grund zu der Annahme, dass die MHC-II-Expression durch Schwann-Zellen ein Ausdruck spezieller, sozusagen „schlummernder“ Eigenschaften dieser Zellen sein könnte, welche sich erst in entzündlich veränderter Umgebung manifestieren. Dass diese Beobachtung relevant ist, wird durch den zusätzlichen *in-vivo*-Nachweis von MHC-Komplexen in entzündetem Nervengewebe anhand von Biopsien humaner peripherer Nerven unterstützt (Pollard et al. 1987; Mancardi et al. 1988; Mitchell et al. 1991; Wanschitz et al. 2003). Dabei konnte ebenso eine Steigerung der Expression von MHC-I- und insbesondere auch von MHC-II-Molekülen durch Schwann-Zellen aus Nervenbiopsien von GBS-Patienten gegenüber Kontrollbiopsien aus gesunden Probanden festgestellt werden (Meyer zu Horste et al. 2009). Was allerdings fraglich blieb, ist die funktionelle Relevanz der bei Schwann-Zellen beobachteten MHC-II-Expression.

#### **4.1.2 Schwann-Zellen exprimieren für die Antigenprozessierung notwendige Moleküle**

Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen lässt sich vermuten, dass Schwann-Zellen unter bestimmten Umständen eine Funktion als – sozusagen nicht-professionelle – APC erlangen können. Mit der Fähigkeit zur regulierten Expression insbesondere von MHC-II-Molekülen erfüllen sie diesbezüglich eine wichtige Voraussetzung. Zudem müssen sie auch über die gesamte intrazelluläre Maschinerie verfügen, die zur Antigenprozessierung notwendig ist. Erst kürzlich wurde die Expression dieser komplexen strukturellen Komponenten in Schwann-Zellen detailliert untersucht. Im Rahmen dieser Experimente konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für die Antigenprozessierung wichtige Moleküle wie die konstitutiven proteasomalen Untereinheiten MB1 (X) und Delta (Y), die immunproteasomale Untereinheit LMP2 sowie die Moleküle TAP2, *Tapasin*, *Calnexin* und *Calreticulin* unter basalen Bedingungen in Schwann-Zellen nachgewiesen werden. Unter dem Einfluss inflammatorischer Stimuli wurde eine gesteigerte Expression der Untereinheit Delta (Y)

sowie von TAP2 beobachtet. Zudem konnte in GBS-Patienten eine im Vergleich zu gesunden Probanden gesteigerte Synthese dieser beiden Moleküle durch Schwann-Zellen anhand vergleichender Untersuchung von Nervenbiospien nachgewiesen werden. In einem weiteren Schritt wurde auch die Aufnahme und intrazelluläre Digestion von exogenem Antigen durch Schwann-Zellen demonstriert (Meyer zu Horste et al. 2009). In weiteren *in-vitro*-Untersuchungen konnte zudem neben der Phagozytose von exogenem Myelinantigen auch die Präsentation sowohl exogener als auch endogener Antigene durch Schwann-Zellen an spezifische T-Zell-Linien nachgewiesen werden (Wekerle et al. 1986; Bigbee et al. 1987; Lilje 2002). Der Erreger der Lepra, *Mycobacterium leprae*, weist einen ausgeprägten Schwann-Zell-Tropismus auf und eignet sich daher gut zur Untersuchung der Antigenpräsentation durch Schwann-Zellen (Rambukkana et al. 2002). Die Präsentation von Lepra-Antigen durch infizierte Schwann-Zellen konnte experimentell eine Deletion infizierter Schwann-Zellen sowohl durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen als auch durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren (Steinhoff und Kaufmann 1988; Ford et al. 1993; Spierings et al. 2001). Durch diese Beobachtungen ergaben sich verschiedene Hinweise, welche die Vermutung stützen, dass Schwann-Zellen eine Funktion als konditionelle APC besitzen.

## 5 Zielsetzung der Arbeit

Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass Schwann-Zellen unter bestimmten Bedingungen MHC-Moleküle sowie damit zusammenhängend weitere Komponenten des intrazellulären Antigenprozessierungsapparates exprimieren. Weitere Ergebnisse legten zudem nahe, dass diese Faktoren unter inflammatorischen Stimuli, wie etwa in entzündlichen Neuropathien, einer regulierten, differenziellen Expression unterliegen, also für diese Erkrankungen möglicherweise pathophysiologisch relevant sein könnten. Detaillierte, vor allem funktionelle Untersuchungen, insbesondere auch zur Kreuzpräsentation von Antigen, waren jedoch nicht verfügbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung, ob Schwann-Zellen in funktionell relevantem Umfang Antigen prozessieren und antigenspezifischen T-Zellen präsentieren. Hierzu wurde ein Kokultursystem mit Schwann-Zellen als Stimulator- und OT-Zellen als Responderzellen etabliert, welches neben der Präsentation von exogenem Antigen insbesondere auch die Untersuchung der Präsentation von endogenem Antigen durch eine Transfektion der Stimulatorzellen mit einer ein spezifisches Antigen codierenden cDNA

zuließ. Desweiteren sollte überprüft werden, in welchem Ausmaß Schwann-Zellen durch Präsentation von Antigen exogener bzw. endogener Herkunft spezifisch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen stimulieren und zur Proliferation anregen können.

Solche Ergebnisse sind von herausragender Bedeutung für das Verständnis entzündlicher Neuropathien. Ferner könnte dies eine mögliche Grundlage für zukünftige therapeutische Interventionen im Menschen sein.



## II Material und Methoden

### 1 Generell benötigtes Material

#### 1.1 Technische Geräte und Arbeitsmaterialien

Absaugpumpe	Haep Labor Consult
Agarose-Elektrophorese System PerfectBlue Mini S	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Autoklav	Fritz Gössner, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
CO <sub>2</sub>	Linde, München
CO <sub>2</sub> -Inkubator (Cell Heraeus)	Thermo Scientific, Osterode
Combitips plus (2,5 ml, 5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen (13 mm Durchmesser)	Thermo Fisher Scientific, Langensfeld
Durchflusszytometer, FACS CantoII System 8-color	BD Biosciences, Heidelberg
Einfrierhilfe Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Langensfeld
Einmalskalpelle (Feather, Nr. 10, 11)	pfm, Köln
Einmalspritzen (1, 2, 5, 10, 20 ml)	B. Braun Melsungen, Melsungen
FACS-Röhrchen (75 mm x 12 mm)	BD Falcon, Heidelberg
Feinwaage Mettler AE 163	Mettler Toledo, Gießen
Fluoreszenzmikroskop, Auflicht (Axioplan 2)	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop, invers (Eclipse TE200)	Nikon, Düsseldorf
Gasbrenner Labogaz 206	VWR International, Darmstadt
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach an der Riss
Glaspasteurpipetten (230 mm)	Brand, Wertheim
Glaswaren (Schott)	VWR International, Darmstadt
Kanülen (Sterican, Größe 1, 2, 20)	B. Braun Melsungen, Melsungen
Kryokonservierungsröhrchen (2 ml, screw cap)	Greiner Bio-One, Solingen
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riss
Küvetten (UVette)	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	Will-Wetzlar, Wetzlar
MACS Trennsäulen (LS, MS)	Miltenyi Biotec, Bergisch-

Magnetrührer mit Heizplatte (Heidolph, MR 3002)	Gladbach
Multipette plus	neoLab, Heidelberg
NanoDrop (ND-1000)	Eppendorf, Hamburg
Nucleofector II	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Objektträger	Amaxa biosystems, Köln
	Thermo Fisher Scientific,
	Langenselbold
Parafilm	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Maschine (Gene AmpPCR System 9700)	Applied Biosystems, Darmstadt
PCR Softstrips (0,2 ml)	Biozym, Oldendorf
Perfusorspritzen (50 ml)	B. Braun Melsungen, Melsungen
Petrischalen (5 cm, 10 cm Durchmesser)	Greiner Bio-One, Solingen
pH-Meter (766 Calimatic)	Knick, Berlin
Photometer (Biophotometer)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (+/- Filter Tips)	Starlab, Ahrensburg
Pipettierhilfe (IBS Pipetboy acu)	VWR International, Darmstadt
Power Supply (Modell 200/2.0)	Bio-Rad Laboratories, München
Präparationsbesteck	VWR International, Darmstadt
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator (Minitron)	Înfors, Bottmingen, Schweiz
Separator QuadroMACS, OctoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Spritzenvorsatzfilter (Minisart, 0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech,
	Göttingen
Sterilbank (HERA Safe)	Thermo Scientific, Osterode
Stickstoff, flüssiger	Linde, München
Stickstofftank	Tec-Lab, Königsstein/Taunus
Stripetten (Corning, 1, 5, 10, 25 ml)	Welabo, Düsseldorf
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator (E.A.S.Y RH)	Herolab, Wiesbaden
Vortexer	VWR International, Darmstadt
Waage (KB 1600-2)	Kern & Sohn, Balingen
Wasserbad (W 350)	Memmert, Schwabach

Zählkammer Neubauer	Brand, Wertheim
Zellkulturgefäße (T-25; T-75; 6-, 12-, 24-, 48-, 96-Well)	Greiner Bio-One, Solingen
Zellsieb (Nylon, 40 µm)	BD Falcon, Heidelberg
Zentrifugationsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Solingen
Zentrifuge (Heraus Fresco 17)	Thermo Scientific, Osterode
Zentrifuge (Multifuge 3 S-R)	Thermo Scientific, Osterode
Zentrifuge (Sorvall RC 5B Plus)	Thermo Scientific, Osterode
Zentrifugenbecher (Sorvall 250 ml)	Thermo Scientific, Osterode
Zentrifugenrotor (Sorvall GSA)	Thermo Scientific, Osterode
Zentrifugenrotor (Sorvall SS-34)	Thermo Scientific, Osterode
Zentrifugenröhrchen (Sorvall 30 ml)	Thermo Scientific, Osterode

## 1.2 Software

BD FACSDiva Software	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo7	Tree Star, Ashland, OR, 97520 USA
Creative Suite 3 Design Standard	Adobe Systems, München
Prism5 Windows	GraphPad Software, Inc La Jolla, CA 92037 USA

## 1.3 Chemikalien und Bioreagenzien

Aceton	Merck Chemicals, Darmstadt
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Ammoniumchlorid (BD PharmLyse)	BD Biosciences, Heidelberg
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua dest. (Milli-Q plus)	Millipore, Eschbo
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
5(6)-Carboxyfluoresceindiacetat-N-Succimidylester (CFSE)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS, Ca & Mg frei, 1x)	PAA-Laboratories, Pasching

Essigsäure	Merck Chemicals, Darmstadt
Ethanol	Merck Chemicals, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Foetales Kälberserum (FCS Gold)	PAA-Laboratories, Pasching
Forskolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Geneticin (G418)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glucose	Merck Chemicals, Darmstadt
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Merck Chemicals, Darmstadt
Granulocyte macrophage colony-stimulation factor (GM-CSF)	erhalten von Dr. Anne-Kathrin Mausberg, Universität Düsseldorf
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Invitrogen, Karlsruhe
Isofluran Delta Select	Delta Select, Dreieich
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Chemicals, Darmstadt
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck Chemicals, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck Chemicals, Darmstadt
Natriumacetat	Merck Chemicals, Darmstadt
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck Chemicals, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck Chemicals, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck Chemicals, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Merck Chemicals, Darmstadt
6x Orange Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Chemicals, Darmstadt
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-D-Lysin (PDL)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rekombinantes murines Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )	R&D, Wiesbaden
Salzsäure (HCl)	Merck Chemicals, Darmstadt
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe

Terralin protect	Schülke, Norderstedt
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck Chemicals, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (0,05%)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	Difco, Detroit, USA

#### 1.4 Kits

Basic Nucleofector Kit for Primary Neurons	Amaya biosystems, Köln
CD4 <sup>+</sup> (L3T4) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

## 2 Medien und Puffer

### 2.1 Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1 g/l Glucose, L-Glutamin, Pyruvat für Schwann-Zellen und OT-Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1 g/l Glucose, ohne Glutamin für BMDC	Invitrogen, Karlsruhe
Schwann-Zell-Kulturmedium:	DMEM 2 mM L-Glutamin 10% FCS 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 2 µM frisch dazugegebenes Forskolin

BMDC-Antibiotikafreies Zellkulturmedium:	DMEM 2 mM L-Glutamin 10% FCS 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol 2,4% GM-CSF-Überstand
BMDC-Vollmedium:	DMEM 2 mM L-Glutamin 10% FCS 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol 2,4% GM-CSF-Überstand 50 U/ml Penicillin 50 $\mu$ g/ml Streptomycin
OT-Zell-Kulturmedium:	DMEM 2 mM L-Glutamin 5% FCS 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol 10 mM HEPES 50 U/ml Penicillin 50 $\mu$ g/ml Streptomycin
Kryomedium:	40% DMEM 40% FCS 20% DMSO

## 2.2 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium:	Aqua dest. 1% NaCl 1% Trypton 0,5% Hefeextrakt pH 7, autoklaviert 100 $\mu$ g/ml Ampicillin / 50 $\mu$ g/ml Kanamycin steril filtriert
------------	---

LB-Agar:	20 g Agar 1 l LB-Medium
SOC-Medium:	0,5% Hefeextrakt 2% Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose

### 2.3 Puffer

FACS-Puffer:	PBS 1% FCS steril filtriert
MACS-Puffer:	PBS 0,5% BSA 5 mM EDTA entgast, steril filtriert
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE):	40 mM Tris-Acetat 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA pH 7,4

### 3 Proteine

Ovalbumin (Grade VI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
OVA Peptide 257-264 (SIINFEKL)	Peptides International, Kentucky, USA
OVA Peptide 323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR)	Peptides International, Kentucky, USA





	erhalten von Prof. H. Wiendl, Würzburg
pIRES2-DsRed-Express	5,3 kb, erhalten vom Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, Hr. Cadeddu, Hr. Büst
pUC19	2,7 kb, Invitrogen, Karlsruhe
pmaxGFP	3,5kb, Amaxa biosystems, Köln

#### 4.2 Enzyme

Die aufgeführten Enzyme wurden mit den dazugehörigen Puffern zugesendet und bei -20°C gelagert.

Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
EcoRI	
NcoI	
T4 DNA-Ligase	Roche Applied Science, Mannheim
rAPid Alkaline Phosphatase	Roche Applied Science, Mannheim

#### 4.3 DNA-Größenstandard

O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
------------------------------	-------------------------

#### 4.4 Sequenzierungsprimer

Die unten aufgeführten Sequenzierungsprimer stammen von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) und wurden nach Rekonstitution in sterilem Aqua dest. in einer Konzentration von 0,1 mM bei -20°C gelagert.

Primer	Sequenz (5'→3')
OVA-FRD-1	ATG GGC TCC ATC GGC GCA GC
OVA-FRD-2	CAA ACA GCT GCA GAT CAA GCC
OVA-FRD-3	ACG TGT TTA GCT CTT CAG CC
OVA-FRD-4	GGC AGA TGT GTT TCC CCT TAA

OVA-FRD-5	AAT GCA ACC TGA TAC ATC AGC
OVA-FRD-6	TCT CTG TGT TCC TGA TAC TAC
OVA-FRD-7	GTA TTA GTC ATC GCT ATT ACC
OVA-REV-1	TTA AGG GGA AAC ACA TCT GCC
OVA-REV-2	ACT CTC AAG CTG CTC AAG GCC
OVA-REV-3	TCT CTA AGT GAA GAG TGA ACG
OVA-REV-4	CTT GCT GCG CCG ATG GAG CCC
OVA-REV-5	AGG AAC AAA AGA GCA CAT
OVA-REV-6	ACA TGT AAA GCA TGT GCA CCG

#### 4.5 DNA-Sequenzierung

Durchgeführt vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf, Moorenstraße 1, 40225 Düsseldorf.

#### 4.6 Bakterienstämme

One Shot Top10 Chemically Comp. E.coli                      Invitrogen, Karlsruhe

### 5 Eukaryontische Zelllinien

OTI                      aus OTI-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund (Stamm 007080)  
exprimieren einen T-Zell-Rezeptor, welcher spezifisch MHC-I-  
restringiertes Ovalbumin-Peptid der Aminosäuren 257-264 erkennt  
Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA

OTII                      aus OTII-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund (Stamm 004194)  
exprimieren einen T-Zell-Rezeptor, welcher spezifisch MHC-II-  
restringiertes Ovalbumin-Peptid der Aminosäuren 323-339 erkennt  
Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA

SV40tsA58                      konditionell immortalisierte Schwann-Zellen aus transgenen Mäusen

(H-2Kb-tsA58), exprimieren das temperatursensitive SV40-Large-T-Onkogen unter der Kontrolle des IFN- $\gamma$ -H-2Kb-Promotors (Saavedra et al. 2008)

erhalten von Anneloor ten Asbroek, Amsterdam, NL

## **6 Mauslinien**

C57BL/6 in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und gehalten

## 7 Zellkultur

### 7.1 Einfrieren und Auftauen

Eukaryontische Zellen können in DMSO/serumhaltigem Kryomedium in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  über einen längeren Zeitraum gelagert werden. DMSO verhindert die intrazelluläre Ausbildung von Kristallen und schützt die Zellen, ebenso wie langsames Einfrieren und zügiges Auftauen.

Zum Einfrieren wurden die Zellen aus ihren Kulturgefäßen geerntet, die Zellzahl bestimmt (siehe 7.3) und für 7 Minuten bei Raumtemperatur (RT) pelletiert ( $400 \times g$ ). Nach Entfernen des Zentrifugationsüberstandes durch Absaugen wurde das Zellpellet in FCS-haltigem Zellkulturmedium (90% DMEM, 10% FCS) resuspendiert und dann im Verhältnis 1:1 mit Kryomedium (40% DMEM, 40% FCS, 20% DMSO) verdünnt (Endkonzentration: 65% DMEM, 25% FCS, 10% DMSO). Die Zellsuspension wurde in Kryokonservierungsröhrchen überführt (Schwann-Zellen:  $1 \times 10^6$ /Röhrchen, OT-Zellen:  $1 - 3 \times 10^7$ /Röhrchen), in einer Einfrierhilfe für 72 Stunden langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff transferiert und gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellproben aus dem Stickstofftank entnommen, zügig bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad erwärmt und unmittelbar mit auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmtem Zellkulturmedium in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und für 7 Minuten bei RT pelletiert ( $400 \times g$ ). Durch Absaugen des Zentrifugationsüberstandes wurde das toxische DMSO von den Zellen entfernt. Das Zellpellet wurde in Zellkulturmedium resuspendiert, in entsprechende Kulturgefäße überführt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 10%  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre kultiviert.

### 7.2 Zellen passagieren

Zum Passagieren adhärenter Zellen wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit sterilem PBS (1x) gespült. Dieser Waschschrift verhindert, dass das Trypsin/EDTA durch Reste des im Zellkulturmedium enthaltenen FCS vorzeitig inaktiviert wird. Die Zellen wurden anschließend mit Trypsin/EDTA (0,05%) bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 10%  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre für 3 – 5 Minuten inkubiert und das Ablösen durch vorsichtiges Beklopfen der Kulturgefäße unterstützt. Trypsin spaltet die Oberflächenproteine der Zellen und EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, so dass sich die adhärenen Zellen nach entsprechender Behandlung von der Kulturgefäßoberfläche lösen und in Suspension gehen. Die enzymatische

Reaktion wurde mit FCS-haltigem Zellkulturmedium gestoppt und die sich nun in Suspension befindenden Zellen in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und für 7 Minuten bei RT pelletiert (400 x g). Nach Entfernen des Zentrifugationsüberstandes wurde das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert, in neue Kulturgefäße überführt und bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert oder direkt für Experimente verwendet.

Bei Suspensionszellen ist das Trypsinieren der Zellen nicht notwendig. Die Zellen wurden direkt mit dem Zellkulturmedium aus dem Kulturgefäß in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und für 7 Minuten bei RT pelletiert (400 x g). Nach Entfernen des Zentrifugationsüberstandes wurde das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert, in neue Kulturgefäße überführt und bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert oder direkt für Experimente verwendet.

### 7.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung vitaler Zellen erfolgte in einer Neubauer Zählkammer mithilfe des Farbstoffs Trypanblau, welcher durch die defekten Plasmamembranen toter Zellen diffundiert, diese blau-schwarz anfärbt und somit unter dem Lichtmikroskop eine Differenzierung zu den lebenden Zellen ermöglicht.

10 µl der 1:1 mit Trypanblau (0,4%) verdünnten Zellsuspension wurden in die Zählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop mit einem 10-fach vergrößerndem Objektiv die vier großen Eckquadrate im Lichtfeld eingestellt. Avitale Zellen stellten sich durch die Aufnahme von Trypanblau als kleine blau-schwarze, dysmorphe Punkte dar, von denen die großen, runden, durchscheinenden vitalen Zellen klar abgegrenzt werden konnten. Die vitalen Zellen wurden mäanderförmig und unter Beachtung des L-Randes in den vier großen Eckquadraten ausgezählt und die Zellzahl wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor (2)} \times 10^4 = \text{Anzahl vitaler Zellen/ml}$$

Es werden alle vier großen Eckquadrate ausgezählt und die Anzahl aller gezählten Zellen durch 4 geteilt, um einen Mittelwert zu erhalten. Das Volumen eines großen Eckquadrates beträgt 0,1 µl, somit ergibt das 10<sup>4</sup>-fache eine Gesamtzellzahl pro ml.

## 7.4 Kultivierung von Stimulatorzellen

### 7.4.1 Konditionell immortalisierte murine Schwann-Zellen

Die als Stimulatorzellen für die Kokultorexperimente verwendeten konditionell immortalisierten murinen Schwann-Zellen wurden aus transgenen Mäusen vom Stamm H-2Kb-tsA58 gewonnen (Jat et al. 1991; Saavedra et al. 2008). Unter Stimulation mit rekombinantem murinen Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml) exprimieren sie das SV40-Large-T-Onkogen, welches der Kontrolle des IFN- $\gamma$ -H-2Kb-Promotors unterliegt und dessen Konformation bei einer Kultivierungstemperatur von 33°C stabil ist. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer starken Proliferation der Zellen sowie einer geringen Expression Schwann-Zell-typischer Marker wie p75<sup>NGFR</sup> oder S100. Kultivierung bei 37°C ohne IFN- $\gamma$  führt zu morphologischen sowie auch funktionellen Veränderungen der Zellen. Ihre Wachstumsrate ist deutlich verringert, die Synthese typischer Schwann-Zell-Marker wird hochreguliert, die Zellen differenzieren aus und erlangen die Fähigkeit zur Myelinbildung (Saavedra et al. 2008).

Zur Expansion, Transfektion und Selektion wurden die Schwann-Zellen unter den proliferationsfördernden Bedingungen bei 33°C kultiviert, vor der Verwendung für Experimente wurden sie zur Differenzierung für mindestens 2 Wochen auf 37°C umgesetzt.

### 7.4.2 Kultivierung der konditionell immortalisierten murinen Schwann-Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen benötigen bei der Kultivierung mit Poly-D-Lysin (PDL) beschichtete Zellkulturgefäße. Diese synthetischen Moleküle verbessern die adhäsiven Eigenschaften der Zellkulturgefäße durch eine Umkehr der Gefäßoberflächenladung von negativ zu positiv, wodurch die Anhaftung der adhäsionsabhängigen Zellen optimiert wird.

Hierzu wurden die Zellkulturgefäße mit 100  $\mu$ g PDL/ml PBS 30 – 60 Minuten bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert und waren nach Entfernen des Überstandes und dreimaligem Spülen mit PBS gebrauchsfertig für die Kultivierung.

Die Kultivierung erfolgte nach dem Auftauen (siehe 7.1) in T-25- (ca. 2 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml), im weiteren Verlauf dann in T-75-Kulturflaschen (0,5 – 5 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml) bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Beim Erreichen von 80 – 100% Konfluenz wurden die Zellen, je nach Erfordernis, weiter passagiert (siehe 7.2) oder eingefroren (siehe 7.1). Neue Passagen wurden in frischem Zellkulturmedium in neue, PDL-beschichtete Kulturflaschen ausgesät, alle drei

Tage erfolgte ein Zellkulturmediumwechsel. Das Zellkulturmedium (DMEM, 10% FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin) wurde stets frisch mit Forskolin (2 µM) und für zu expandierende Zellen zusätzlich mit IFN-γ (10 ng/ml) supplementiert.

### 7.4.3 Generierung von murinen dendritischen Zellen aus Knochenmark

Aus 6 Wochen alten, weiblichen Mäusen vom Stamm C57BL/6 wurde nach Betäubung mit Isofluran und Genickbruch durch zervikale Dislokation Knochenmark gewonnen. Nach steriler Präparation von Femur und Tibia wurde das Knochenmark mit 8 – 10 ml zusatzfreiem DMEM-Medium mithilfe einer 10-ml-Einmalspritze und aufgesetzter Kanüle aus den Beinknochen herausgespült. Anschließend wurde die partikuläre Knochenmarkmasse sorgfältig resuspendiert und durch ein Zellsieb (Nylon, 40 µm) in ein Zentrifugationsröhrchen filtriert, so dass die Knochenmarkzellen als homogene Suspension vorlagen. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 6°C pelletiert (300 x g), nach Absaugen des Zentrifugationsüberstandes in antibiotikafreiem Zellkulturmedium (DMEM, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 2,4% GM-CSF-Überstand) resuspendiert und anschließend die Zellzahl bestimmt (siehe 7.3). Die Aussaat von  $2 \times 10^5$  Knochenmarkzellen/ml erfolgte in bakteriologischen Petrischalen (10 cm Durchmesser), um ein adhärentes Wachstum der Zellen am Boden des Kulturgefäßes zu verhindern. Der Kultivierungsstart ohne antibiotische Zusätze ermöglichte das frühzeitige Erkennen einer eventuellen Kontamination und der dadurch stimulierten, verfrühten Ausreifung der Zellen. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. An Tag 3 nach Aussaat wurde zu jeder Schale 10 ml Vollmedium (DMEM, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 2,4% GM-CSF-Überstand, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin) dazugegeben, an Tag 6 nach Aussaat wurden ca. 10 ml verbrauchtes Medium durch 10 ml frisches Vollmedium ausgetauscht. Unter der Wirkung des dem Kulturmedium zugesetzten hämatopoetischen Wachstumsfaktors GM-CSF differenzieren die Knochenmarkzellen in dendritische Zellen (*engl. bone marrow-derived dendritic cells*, BMDC). Nach der Differenzierung (ab Tag 8 nach Aussaat) standen die BMDC für Experimente zur Verfügung. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen durch ausgiebiges Spülen aus ihren Kulturschalen geerntet, für 10 Minuten bei 6°C pelletiert (300 x g), in Vollmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe 7.3).

Für MHC-II-Expressionsanalysen erfolgte die erneute Aussaat der BMDC in kleineren bakteriologischen Petrischalen (5 cm Durchmesser) zu ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro Schale. Um eine

Hochregulierung der MHC-II-Expression durch BMDC zu provozieren, wurden dem Kulturmedium verschiedene Konzentrationen IFN- $\gamma$  (1, 100 U/ml) und Lipopolysaccharid (LPS, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zur Prästimulation der Zellen hinzugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse geerntet (siehe 9.4).

Für Kokulturrexperimente mit OT-Zellen (siehe 7.6) wurden die BMDC auf einer 48-Loch-Zellkulturplatte zu ca.  $6 \times 10^4$  Zellen pro Well ausgesät und zur Ausreifung mit IFN- $\gamma$  (1, 10, 100 U/ml), LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Ovalbumin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) prästimuliert.

## 7.5 Kultivierung von Responderzellen

### 7.5.1 Isolierung von OT-Zellen

OTI- bzw. OTII-Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund wurden mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation ad exitum gebracht. Nach steriler Präparation und Entnahme der Milz wurde diese mithilfe des Stempels einer 5-ml-Einmalspritze durch ein Zellsieb (Nylon, 40  $\mu\text{m}$ ) in eine Petrischale (Durchmesser 5cm) mit 5 ml Zellkulturmedium (DMEM, 2 mM L-Glutamin, 5% FCS, 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol, 10 mM HEPES, 50 U/ml Penicillin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin) gestrichen, so dass am Ende die porengängigen Lymphozyten und Erythrozyten in Suspension vorlagen. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugationsröhrchen überführt, für 8 Minuten bei 6°C pelletiert (400 x g) und danach der Zentrifugationsüberstand durch Absaugen entfernt. Die im Zellpellet enthaltenen Erythrozyten wurden durch Lysieren mit einer Ammoniumchlorid-Pufferlösung entfernt, in welcher sich Ammoniak( $\text{NH}_3$ )- und  $\text{CO}_2$ -Moleküle im Gleichgewicht mit Ammonium( $\text{NH}_4^+$ )- und Bicarbonat( $\text{HCO}_3^-$ )-Ionen befinden. Die gemeinsam mit Wasser in die Erythrozyten einströmenden  $\text{NH}_3$ -Moleküle werden spontan durch das zahlreich in Erythrozyten vorkommende Enzym Carboanhydrase in  $\text{NH}_4^+$ -Ionen umgewandelt. Dies sorgt für einen ständigen Nachstrom von Ammoniak und Wasser, welcher schließlich zur Lyse der Erythrozyten führt. Leukozyten werden dagegen weitestgehend von der Lyse verschont. Das zunächst rote Zellpellet wurde in 5 ml Ammoniumchloridlösung (1:10 verdünnt in Aqua dest.) resuspendiert und die Lysereaktion nach 10-minütiger Inkubation bei RT und Dunkelheit durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium gestoppt. Anschließend wurde erneut für 8 Minuten bei 6°C zentrifugiert (400 x g). Nach Entfernen des Zentrifugationsüberstandes durch Absaugen wurde das nun weiße, erythrozytenfreie Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium



resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe 7.3). Im direkten Anschluss erfolgte mit Teilen der Milzzellen die Separation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch das sogenannte MACSen (Magnetic-activated cell sorting, siehe 9.1).

Die so aufgereinigten Milzzellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen standen nun für Experimente zur Verfügung. Nicht benötigte Milzzellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in Kryomedium resuspendiert und eingefroren (siehe 7.1). Der Begriff OT-Zellen wird nachfolgend im Falle der OTI-Zellen für OTI-Milzzellen, im Falle der OTII-Zellen für über MACS aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Die Durchführung der Kokulturrexperimente mit den OTII-Zellen erfolgte deshalb mit aufgereinigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, um einen verfälschenden Einfluss potenzieller antigenpräsentierender Zellen (APC) aus dem Pool der Milzzellen auf die Proliferation der OTII-Zellen auszuschließen.

### **7.5.2 Intrazellulärfärbung mit Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester (CFSE)**

CFSE permeiert durch die Zellmembran lebender Zellen und reichert sich intrazellulär an. Zelluläre Esterasen spalten Acetatgruppen ab, wodurch das Molekül seine membrangängige Eigenschaft verliert. Es entsteht ein grün fluoreszierender Farbstoff, der sich bei jeder Zellteilung zur Hälfte auf die Tochterzellen verteilt, dadurch aber auch seine Fluoreszenzintensität verringert. Durch Zellproliferation entstandene markierte Subpopulationen wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse anhand der Detektion des CFSE-Fluoreszenzsignals im FITC-Kanal gemessen.

Die in Suspension befindlichen, zu färbenden OT-Zellen wurden zunächst erneut für 8 Minuten bei RT zentrifugiert (400 x g) und das Pellet nach Absaugen des Überstandes in einer Konzentration von  $10 \times 10^6$  Zellen/ml in PBS/0,1 % BSA resuspendiert. Die CFSE-Stocklösung (2 mM in DMSO) wurde 1:500 in PBS/0,1 % BSA verdünnt und dann 1:1 mit der Zellsuspension gemischt, so dass eine Endkonzentration von 2 µM CFSE und eine Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml vorlagen. Nach kurzem Vortexen und 10-minütiger Inkubation im Wasserbad bei 37°C und Dunkelheit wurde die Färbung durch Zugabe von 10% Vol. purem FCS gestoppt und dann für 8 Minuten bei RT pelletiert (400 x g). Die gefärbten Zellen wurden nach einem weiteren Waschschrift mit FCS-haltigem Medium dann in Zellkulturmedium (DMEM, 2 mM L-Glutamin, 5% FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 10 mM HEPES, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin) resuspendiert und auf die zur Aussaat benötigte Zellzahl eingestellt.

## 7.6 Kokultivierung von Stimulator- und Responderzellen

Für die Kokultivierung wurden 48-Well-Zellkulturplatten verwendet, die Inkubation und Kultivierung erfolgte stets bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Zunächst wurden die Stimulatorzellen in je 1 ml Medium (BMDC: DMEM, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 2,4% GM-CSF-Überstand, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, ca. 6 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml; Schwann-Zellen: DMEM, 10% FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 2 µM frisches Forskolin, ca. 1 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml) auf die Wells ausgesät und dann entsprechend dem unten aufgeführten Pipettierschema prästimuliert (siehe Tabelle 1). Nach der Prästimulation wurde das Medium von allen Wells vollständig entfernt, einmal sorgfältig mit PBS gewaschen und die zuvor aufbereiteten CFSE-gefärbten Responderzellen in je 1 ml OT-Zell-Kulturmedium (DMEM, 2 mM L-Glutamin, 5% FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 10 mM HEPES, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin) dem Pipettierschema entsprechend hinzugefügt. Zu Proben mit OTI-Zellen wurde außerdem das Oligopeptid Ova<sub>257-264</sub>, zu Proben mit OTII-Zellen Ova<sub>323-339</sub> zugegeben. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden Kultivierung wurde das Proliferationsverhalten der Responderzellen mittels Detektierung der CFSE-Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen.

**Tabelle 1: Pipettierschema für die Kokultivierung von Stimulator- und Responderzellen**

		Stimulatorzellen									
		Schwann-Zellen (1x10 <sup>4</sup> /Well)				BMDC (6x10 <sup>4</sup> /Well)					
<b>Prästimulation</b>	IFN-γ (U/ml)	0	1	10	100	48h	0	1	100		24h
	LPS (µg/ml)									1	
	+/- Ovalbumin	10 µg/ml					10 µg/ml				
<b>Responderzellen</b>	<b>OTI-(Milz-)Zellen</b>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>						
	<b>CD4<sup>+</sup> OTII-Zellen</b>	6x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>4</sup>		6x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>4</sup>	
<b>Stimulation</b>	+/- Ova <sub>257-264</sub>	10 µM (nur in Wells mit OTI)									
	+/- Ova <sub>323-339</sub>	10 µM (nur in Wells mit OTII)					10 µM				
	+/- Ovalbumin	10 µg/ml					10 µg/ml				
<b>Analysezeitpunkte</b>		24 / 48 / 72 / 96 Stunden nach Ansetzen der Kokultur									

## 7.7 Transfektion eukaryontischer Zellen

Spezielle Materialien, Puffer und Lösungen für die Nukleofektion stammen aus dem Basic Nucleofector Kit for Primary Neurons der Firma Amaxa biosystems GmbH, ebenso das Gerät Nukleofektor I.

Zur Generierung Ovalbumin exprimierender Schwann-Zellen wurde die Methode der Transfektion durch Nukleofektion gewählt. Der Methode liegt das Prinzip der Elektroporation zugrunde, wobei zunächst durch einen elektrischen Puls die Zellmembran zeitweise eröffnet wird und dann ein elektrisches Feld entsteht, in welchem die in speziellen Puffern komplexierte DNA direkt in den Zellkern transferiert wird. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen ist dabei wegen der zellspezifischen Puffer und Nukleofektionsbedingungen sehr hoch. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Die Schwann-Zellen wurden jeweils mit 3 µg DNA (1 µg pmaxGFP, 2 µg pIRES2-OVA-DsRed-Express) transfiziert. Als Nukleofektionskontrolle dienten das kotransfizierte pmaxGFP, sowie gepulste und nicht gepulste Zellen ohne zugegebene DNA. Die Proben wurden nach der Transfektion auf eine PDL-beschichtete, mit 1 ml DMEM/10% FCS pro Well bei 37°C präinkubierte 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch komplettes Zellkulturmedium (DMEM, 10% FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 2 µM frisches Forskolin) ersetzt. Die Effizienz der Nukleofektion wurde am Fluoreszenzmikroskop anhand der grünen Fluoreszenz des durch das kotransfizierte pmaxGFP exprimierten Green Fluorescent Protein (GFP) beurteilt.

## 7.8 Selektion transfizierter Zellen

Das Plasmid pIRES2-OVA-DsRed-Express besitzt eine Kanamycin/Neomycin-Kassette, welche mit diesem Plasmid transfizierten eukaryotischen Zellen eine Resistenz gegenüber Geneticin (G418) verleiht und somit eine Selektion ermöglicht. Das Aminoglykosid G418 hemmt die Proteinsynthese in nicht transfizierten Zellen, was ein Absterben dieser Zellen zur Folge hat.

Um aus transient Ovalbumin exprimierenden Schwann-Zellen stabil transfizierte Zellen zu gewinnen, wurden die transfizierten Zellen unter Selektionsdruck mit 150 µg/ml G418 kultiviert, alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem G418. Nach 10-15 Tagen erhielt man so eine stabil transfizierte Zellpopulation. Als Kontrolle dienende, nicht transfizierte Zellen verstarben unter gleicher G418-Konzentration komplett im gleichen Zeitraum.

## 8 Molekularbiologische Methoden

### 8.1 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau der Ausgangsplasmide (pAC-Neo-OVA, pIRES2-DsRed-Express) mit EcoRI (New England BioLabs) diente zunächst der Gewinnung von Insert- und Vektor-DNA für die spätere Ligation (siehe Tabelle 2, präparativer Ansatz). Da bei einer Ligation (siehe 8.6) die Insert-DNA wegen identischer flankierender Restriktionsschnittstellen sowohl in der normalen Leserichtung als auch umgekehrt in die Vektor-DNA integriert werden konnte, mussten zudem später die transformierten Ligationsprodukte nach einer DNA-Schnellpräparation (siehe 8.8.1) durch restriktive Spaltung mit EcoRI und NcoI (New England BioLabs) auf die Richtigkeit der Leserichtung geprüft werden (siehe Tabelle 2, analytischer Ansatz).

**Tabelle 2: Pipettierschema für den EcoRI-Restriktionsverdau der Ausgangsplasmide**

<b>präparativer Ansatz</b>	<b>analytischer Ansatz</b>
20 µg Plasmid-DNA	1-2 µg Plasmid-DNA
40 U Restriktionsenzym	2-5 U Restriktionsenzym
20 µl 10x Reaktionspuffer	2 µl 10x Reaktionspuffer
ad 200 µl Aqua dest.	ad 20 µl Aqua dest.

Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte jeweils in autoklavierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1,5 ml) für 3 Stunden bei 37°C, die Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Restriktionsprodukte wurden entweder sofort weiter verwendet oder bei -20°C zwischengelagert.

### 8.2 DNA-Elektrophorese in Agarosegelen

Durch eine Agarose-Gelelektrophorese können die während des Restriktionsverbaus entstandenen DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt und anschließend isoliert werden. Agarosepolymerfäden bilden dabei ein Netz, dessen Dichte durch die Agarosekonzentration bestimmt wird. Durch dieses Netz wandern im elektrischen Feld die negativ geladenen

Nukleinsäurefragmente in Richtung Kathode, wobei die kleineren Fragmente schneller durch die Agarose wandern können, was eine Größenauftrennung der Nukleinsäurefragmente zur Folge hat. Die Agarose und das verwendete Agarose-Elektrophorese System PerfectBlue Mini S stammen von der Firma peqlab Biotechnologie.

In Abhängigkeit von der Größe der zu spaltenden DNA wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8% bis 1% verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine kristall- und schlierenfreie Lösung entstanden war. Diese wurde nach Abkühlung auf ca. 50°C mit 0,05% Ethidiumbromid versetzt und anschließend für eine vollständige Aushärtung in einen Gelträger mit Gelkamm gegossen. Zum Beladen wurde das Gel in die mit 1 x TAE gefüllte Gelelektrophoresekammer gelegt und in die entstandenen Geltaschen die DNA-Proben, vermischt mit 6x Orange Loading Dye (Fermentas), pipettiert. Als DNA-Größenmarker wurde O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter einer Spannung von 100 Volt für 45 – 55 Minuten. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA-Fragmente, welche dadurch unter Beleuchtung mit UV-Licht sichtbar werden.

### **8.3 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Die verwendeten Pufferlösungen und Säulen stammen aus dem QIAquick Gel Extraction Kit von der Firma Qiagen (Düsseldorf).

Die DNA-Fragmente aus der vorangegangenen Agarose-Gelelektrophorese wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und anschließend nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Dabei wird die DNA in einer Hochsalzlösung an die Silikat-Membran der Säulen gebunden, gewaschen und mit Niedrigsalzlösungen von der Membran eluiert. Die eluierte DNA wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei -20°C zwischengelagert.

### **8.4 Konzentrationsbestimmung von gelöster DNA**

Die Konzentration der gelösten DNA wurde am Biophotometer der Firma Eppendorf mittels Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm automatisch bestimmt.

### **8.5 Dephosphorylierung von Vektor-DNA**

Da die T4-DNA-Ligase nur 5'-phosphorylierte DNA-Enden ligiert, können Vektor-Religationen vermieden werden, indem die 5'-Phosphatgruppen an den Vektor-DNA-Enden mit dem dephosphorylierenden Enzym rAPid Alkaline Phosphatase (Roche) entfernt werden. Die Durchführung erfolgte laut dem Protokoll des Herstellers. Die dephosphorylierte Vektor-DNA wurde sofort weiter verwendet oder bei -20°C zwischengelagert.

### **8.6 Ligation von DNA**

Die Ligation der aufgereinigten Vektor- und Insert-DNA-Fragmente erfolgte mithilfe der T4-DNA-Ligase von der Firma Roche. Sie verknüpft die Restriktionsenden der DNA-Fragmente mittels Esterbildung zwischen 5'-Phosphatgruppe und 3'-Desoxyribose. Die Durchführung erfolgte laut dem Protokoll des Herstellers. Als Ligationkontrolle diente nicht dephosphorylierter Vektor ohne Insert. Die ligierte DNA pIRES2-OVA-DsRed-Express wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei -20°C zwischengelagert.

### **8.7 DNA-Transformation in chemisch kompetente Bakterien**

Bei der Vermehrung von Bakterien werden neben der Bakterien-DNA mithilfe der enzymatischen Ausstattung der Bakterien ebenfalls transformierte Plasmide repliziert. Dadurch dient die DNA-Transformation in kompetente Bakterien in der Molekulargenetik zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA.

Die Transformation kompetenter Bakterien (One Shot Top10 Chemically Competent E.coli, Invitrogen) mit der neu klonierten Plasmid-DNA pIRES2-OVA-DsRed-Express erfolgte über die chemische Methode. Dabei werden die Bakterien in Anwesenheit der zu transformierenden Plasmid-DNA einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt, wodurch kurzweilige Poren in der Zellwand der Bakterien entstehen, welche die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien ermöglichen. Als Transformationskontrolle diente die im Kit enthaltene Plasmid-DNA pUC19. Die Durchführung erfolgte laut dem Protokoll des Herstellers.

Die transformierten Bakterien wurden zur Vervielfältigung auf vorgewärmte Agarplatten mit Antibiotikazusatz ausplattiert. Erfolgreich mit pIRES2-OVA-DsRed-Express transformierte Bakterien konnten auf LB Agar mit 50 µg/ml Kanamycin ungehindert wachsen, da sie durch die Kanamycin/Neomycin-Kassette in der Plasmid-DNA vor der Proteinsynthesehemmung

durch das Kanamycin geschützt waren. Für die Transformationskontrolle pUC19 wurde LB Agar mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet, da die mit pUC19 transformierten Bakterien eine Resistenz gegenüber der zellwandzerstörenden Wirkung von Ampicillin und der daraus folgenden Teilungsunfähigkeit besitzen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

## **8.8 Präparation von Plasmid-DNA**

Spezielle Materialien, Puffer und Lösungen für die DNA-Präparation stammen aus dem QIAprep Spin Miniprep Kit sowie dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Beide Kits beruhen auf dem Prinzip, dass die DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze an die Silikat-Gel-Membran in den Säulen gebunden wird, die nach dem Waschen mit Niedrigsalzlösungen von der Membran eluiert werden.

### **8.8.1 Schnellpräparation**

Für die DNA-Schnellpräparation wurden die zuvor hergestellten Transformationsplatten verwendet. Anzucht der Bakterienkultur und anschließende Aufreinigung der DNA erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers. Die so aufgereinigte DNA wurde sofort weiter verwendet oder bei -20°C zwischengelagert.

Ein Rest der so hergestellten Bakterienkultur wurde bei 4°C gelagert und nach erfolgreicher Überprüfung des Ligationsproduktes mittels Restriktionsverdau im analytischen Ansatz für eine Animpfung einer endotoxinfreien Großpräparation verwendet.

### **8.8.2 Endotoxinfreie Großpräparation**

Zur Gewinnung einer ausreichenden Menge korrekt ligierten Plasmids wurde der Rest der Übernachtskultur aus der DNA-Schnellpräparation verwendet. Anzucht der Bakterienkultur und anschließende Aufreinigung der DNA erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers. Die so aufgereinigte DNA wurde sofort weiter verwendet oder bei -20°C zwischengelagert. Anschließend wurden eine Überprüfung der DNA mittels Restriktionsverdau und eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

## 9 Immunologische Methoden

### 9.1 MACS (Magnetic-activated cell sorting)

Spezielle Materialien, Puffer und Lösungen für die magnetische Separation stammen aus dem Kit CD4<sup>+</sup> (L3T4) MicroBeads, mouse von der Firma Miltenyi Biotec, ebenso die Säulen und die Magneten.

Mittels Magnet-aktivierter Zellseparation lassen sich Zellsubpopulationen, welche sich durch spezifische Zellstrukturen wie etwa bestimmte Oberflächenmoleküle kennzeichnen, isolieren. Dabei werden Zellen, die zuvor mit einem an Magnetpartikel (MicroBeads) gekoppelten, spezifisch an bestimmte Strukturen bindenden Antikörper markiert wurden, durch magnetische Kräfte in einer Magnetsäule zurückgehalten, während alle übrigen Zellen die Säule einfach durchfließen.

Die Separation der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus den wie oben beschriebenen gewonnenen OT-Zellen wurde laut dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurden nach Entnahme der für die ungefärbten Kontrollen nötigen Menge die übrigen Zellen wie oben beschrieben mit CFSE gefärbt und auf die zur Aussaat benötigte Zellzahl eingestellt.

### 9.2 Immunzytochemie/Indirekte Immunfluoreszenz (ICC/IF)

Mittels indirekter Immunfluoreszenz können spezifische extrazelluläre und intrazelluläre, sowohl zytoplasmatische als auch intranukleäre Zellstrukturen durch Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Dabei lassen sich, gegenüber der Durchflusszytometrie, auch Verteilung und Lokalisation der angefärbten Zellstrukturen optisch beurteilen. Somit kann die Immunfluoreszenz gewissermaßen als ein optisches Korrelat zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie dienen. Das Prinzip beruht auf der Bindung spezifisch gegen ein Zielantigen gerichteter Primärantikörper, an die in einem zweiten Schritt fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper binden, deren Fluoreszenzsignale unter einem Mikroskop detektiert werden.

Zu färbende Schwann-Zellen wurden 24 – 48 Stunden nach der Aussaat auf PDL-beschichtete Deckgläschen (13 mm Durchmesser) zweimal mit PBS gewaschen und zur Fixierung anschließend in 4% PFA für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen 30 Minuten mit PBS/10% BSA geblockt. Das Medium enthielt



zum Permeabilisieren der Zellmembran zusätzlich 0,03% Triton X-100. Die Erstantikörper ( $\alpha$ -OVA,  $\alpha$ -S100,  $\alpha$ -p75<sup>NTR</sup>) wurden 1:100 in PBS/1% BSA verdünnt und ohne weiteren Waschschrift nach Entfernen des Blockmediums hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Danach wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1:300 in PBS/1% BSA verdünntem Zweitantikörper (Alexa Fluor 488 Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG, Alexa Fluor 594-Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IgG, Cy3-Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IgG) eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert (siehe Tabelle 3). Zum Anfärben der Zellkerne wurde für wenige Sekunden gebrauchsfertige DAPI-Lösung hinzugefügt und danach ein letztes Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf Objektträgern in Glycerol eingedeckt, mit Nagellack luftdicht umschlossen und die so gefärbten Zellen dann am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

**Tabelle 3: Pipettierschema für die Immunfluoreszenzfärbung der Schwann-Zellen**

Zellen	Block	Permeabilisation	Erstantikörper		Zweitantikörper	
Schwann-Zellen	PBS/10% BSA	0,03% Triton	$\alpha$ -p75 <sup>NTR</sup>	1:100	Cy3- $\alpha$ -IgG	1:300
Schwann-Zellen	PBS/10% BSA	0,03% Triton	$\alpha$ -S100	1:100	Alexa Fluor 488- $\alpha$ -IgG	1:300
Schwann-Zellen	PBS/10% BSA	0,03% Triton	$\alpha$ -OVA	1:100	Alexa Fluor 594- $\alpha$ -IgG	1:300

### 9.3 Antigenunabhängige Stimulation muriner T-Zellen

T-Zellen können durch Antikörper gegen CD3, welches zum TCR-Komplex gehört, sowie gegen das kostimulatorische Molekül CD28 antigenunabhängig stimuliert werden. Die daraus folgende T-Zell-Proliferation diente als Positivkontrolle für die antigenabhängige Proliferation antigenspezifischer OT-Zellen nach Kokultivierung mit Stimulatorzellen.

Zur Vorbereitung einer mit plattenbindendem  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  beschichteten 24-Well-Kulturplatte wurde der Antikörper zunächst in 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> / Aqua dest. zu einer Endkonzentration von 5  $\mu$ g/ml verdünnt und anschließend 200  $\mu$ l der Lösung in alle benötigten Kulturwells gegeben. Plattengebundenes  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  führt über eine bessere Quervernetzung und damit Aggregation bindender TCR auf der T-Zell-Oberfläche zu einer Verstärkung des stimulatorischen Signals in der T-Zelle. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden alle Wells dreimal sorgfältig mit PBS/1% BSA gewaschen und CFSE-gefärbte OTII-Zellen zu ca. 2 x 10<sup>5</sup> pro Well auf der Platte ausgesät. Manchen Proben wurde zusätzlich  $\alpha$ -CD28 (2  $\mu$ g je 1 OT-Zell-Medium) in löslicher Form hinzugefügt und die

Zellen danach für mehrere Tage kultiviert (37°C/10% CO<sub>2</sub>). Nach 3 bzw. 5 Tagen wurden Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse entnommen.

#### 9.4 Durchflusszytometrie/FACS (Fluorescence-activated cell scanning)

Das Prinzip der Durchflusszytometrie bedient sich der Tatsache, dass jede korpuskuläre Struktur (so auch Zellen) bei Bestrahlung mit Licht selektiver Wellenlängen nicht nur Licht absorbiert und Streulicht erzeugt, sondern durch Bindung fluoreszierender Farbstoffmoleküle (Fluorochrome) auch Fluoreszenz emittieren kann. Das verwendete Durchflusszytometer (FACS CantoII System 8-color, BD Biosciences) verfügt über ein System mit drei Laserstrahlern (violett, 405 nm; blau, 488 nm; rot, 633 nm) und ermöglicht die Detektion von Fluoreszenzsignalen in 8 verschiedenen Kanälen. Während des Messvorgangs wird der Inhalt der Proben in einer konischen, sich verjüngenden Kanüle angesaugt. Die Zellsuspension fließt dabei in einer umgebenden Trägerflüssigkeit und wird durch hydrodynamische Fokussierung zu einem zentralen, feinen Strom reduziert, in welchem die Zellen einzeln den mit Prismen gebündelten Strahl der drei Laser passieren. Wurden die Zellen zuvor mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern angefärbt, senden sie bei Anregung der Fluorochrome durch Laserlicht Fluoreszenzsignale aus. Ein System selektiv durchlässiger Lichtfilter lenkt diese in Photomultiplier-Tubes, wo sie detektiert und verstärkt werden. Somit ist nach simultaner Färbung ein und derselben Zelle mit mehreren verschiedenen Antikörpern auch die Auftrennung eines komplexen, mehrschichtigen Signals in seine einzelnen Bestandteile möglich. Die amplifizierten Signale können mithilfe der BD FACSDiva Software auf einem Computerbildschirm in Form von Punktwolken (Dot Plots) oder Histogrammen grafisch dargestellt werden. Die Messung von Vorwärts- und Streulicht erlaubt eine Unterscheidung von Zellpopulationen hinsichtlich der Zellgröße (Forward Scatter, FSC) und Granularität (Side Scatter, SSC). Es lassen sich zudem spezifische Subpopulationen aufgrund bestimmter Oberflächenstrukturen abgrenzen, welche durch Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper anhand der emittierten Fluoreszenz im FACS erfasst werden können.

Zur Vorbereitung für die FACS-Analyse wurden die OT-Zellen nach der Kokultivierung mit Schwann-Zellen bzw. BMDC durch sorgfältiges Spülen möglichst ohne gleichzeitige Aufnahme von Stimulatorzellen aus ihren Kulturwells geerntet. Die simultane Entnahme zumindest eines geringen Anteils von Stimulatorzellen ließ sich dabei allerdings nicht gänzlich verhindern, da sich insbesondere die adhärent wachsenden Schwann-Zellen nach

mehrtägiger Kultivierung in den beengten Verhältnissen der 48-Well-Kulturplatte zum Teil bereits spontan abgelöst hatten. Schwann-Zellen wurden durch Trypsinieren abgelöst und dann, analog zu den BMDC, zur durchflusszytometrischen MHC-Expressionsanalyse durch mehrmaliges und sorgfältiges Spülen möglichst vollständig aus ihren Kulturwells geerntet. Die so entnommenen Zellen wurden jeweils umgehend in FACS-Röhrchen überführt. Nach Pelletieren der Zellen für 5 Minuten bei RT (400 x g) wurde das Zellpellet mit FACS-Puffer (PBS/1% FCS) gewaschen und nach Dekantieren des Überstandes der in FACS-Puffer entsprechend verdünnte Antikörper hinzugegeben (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Konzentrationen für die FACS-Analyse von Stimulator- und Responderzellen**

Zellen	Analyse	$\alpha$ -CD4 (APC)	$\alpha$ -CD8a (APC)	Fc-Block	$\alpha$ -MHC-I (FITC)	$\alpha$ -MHC-II (FITC)	$\alpha$ -MHC-II (PE)
Schwann-Zellen	MHC-Expression				1:50	1:50	
BMDC	MHC-Expression			1:25			1:50
OTI-Zellen	T-Zell-Proliferation		1:100				
OTII-Zellen	T-Zell-Proliferation	1:100					

Im Falle der BMDC musste vor der Färbung der MHC-II-Moleküle zunächst ein Fc-Block gemacht werden. Da DC eine hohe Dichte an Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche besitzen, verhindert dieser Zwischenschritt, dass der Antikörper mit seinem Fc-Teil an diesen Rezeptoren bindet. Die BMDC wurden dazu 10 Minuten bei 4°C mit 1:25 verdünntem Fc-Block inkubiert, anschließend wurde der Antikörper direkt dazugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C wurde erneut mit FACS-Puffer gewaschen und danach die Zellen in ca. 200  $\mu$ l pro Röhrchen resuspendiert, um sie dann im Durchflusszytometer analysieren zu können.

Der Vitalitätszustand der Zellen zum Zeitpunkt der FACS-Analyse wurde durch eine Avitalfärbung mit Propidiumiodid (PI) überprüft, einem Fluoreszenzfarbstoff, welcher durch die defekten Membranen abgestorbener Zellen diffundiert und diese anfärbt. Dazu wurde den Proben unmittelbar vor der Messung PI hinzugefügt (Endkonzentration 15 ng/ $\mu$ l). PI emittiert bei Anregung durch Laserlicht ein Fluoreszenzsignal, welches im PerCP-Kanal erfasst werden kann. Die Darstellung der Zellen in einem FSC-vs.-PerCP-Plot ermöglichte eine Abgrenzung der PI-negativen von der PI-positiven Population, damit konnten tote Zellen von der Analyse ausgeschlossen werden.

Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo7 (TreeStar, Ashland, OR), entsprechende Diagramme wurden mithilfe des Programms Prism5 Windows (GraphPad Software, Inc La Jolla, CA) erstellt.

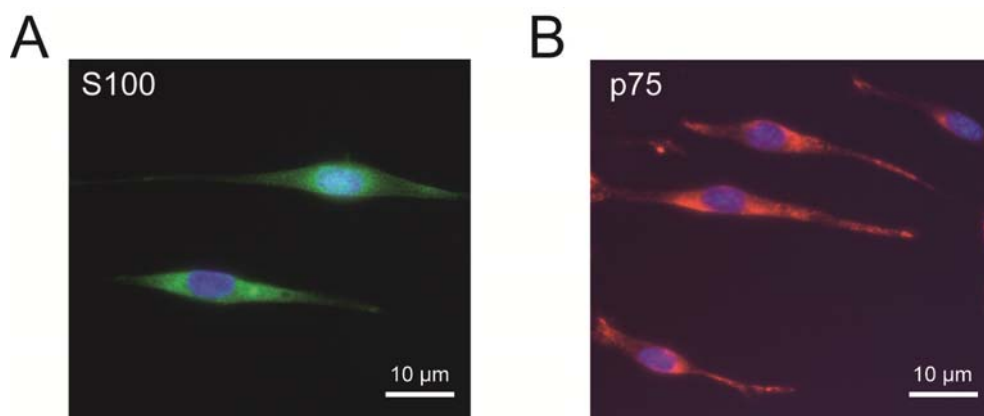
### III Ergebnisse

#### 1 Analyse der Stimulatorzellen

Um die Fähigkeit von Schwann-Zellen zur Antigenpräsentation zu analysieren, wurde ein Kokultursystem mit konditionell immortalisierten murinen Schwann-Zellen als Stimulator- und OT-Zellen als Responderzellen entwickelt und das Proliferationsverhalten der Responderzellen nach verschiedenen Zeitpunkten der Kokultivierung und unter Zugabe verschiedener Antigene durchflusszytometrisch untersucht. Im Vorfeld wurden jedoch zunächst die als Stimulatorzellen fungierenden Schwann-Zellen auf typische Charakteristika dieser Zellart, ihre Vitalität sowie die MHC-Expression unter den verschiedenen prästimulatorischen Bedingungen, und im Falle der transfizierten Zellen auf endogen synthetisiertes antigenes Peptid untersucht.

##### 1.1 Expression von Differenzierungsmarkern auf Schwann-Zellen

Als Stimulatorzellen für die Schwann-Zell-Lymphozyten-Kokulturen wurden konditionell immortalisierte Schwann-Zellen verwendet (Saavedra et al. 2008). Unter Kultivierung bei 33°C und Zugabe von IFN- $\gamma$  konnte ein schnelles Wachstum der Schwann-Zellen beobachtet werden, welches sich nach Umsetzung der Zellkulturen auf 37°C deutlich verlangsamte.



**Abb. 1: Expression der Differenzierungsmarker S100 und p75 durch Schwann-Zellen**

A, B. Konditionell immortalisierte murine Schwann-Zellen wurden nach zweiwöchiger Kultivierung bei 37°C und ohne IFN- $\gamma$  auf Deckgläschen ausgesät und mit Antikörpern gegen S100 und p75<sup>NGFR</sup> gefärbt. Als Zweitantikörper dienten Cy3- $\alpha$ -Kaninchen-IgG (rot) und Alexa Fluor 488- $\alpha$ -Maus-IgG (grün). Die Zellkerne erscheinen nach Färbung mit DAPI blau. A zeigt die Expression von S100 (grün), B stellt die Expression von p75 dar (rot). Der immunzytochemische Nachweis dieser Differenzierungsmarker ist ein Zeichen für den Differenzierungsgrad der Schwann-Zellen.

Nach zweiwöchiger Kultivierung bei 37°C und ohne Zusatz von IFN- $\gamma$  wurden Schwann-Zellen auf Deckgläschen (13 mm Durchmesser) ausgesät und mit Antikörpern gegen die Differenzierungsmarker S100 und p75<sup>NGFR</sup> gefärbt. Abb. 1 zeigt die Expression von S100 (A) sowie p75 (B) als einen Beleg für die Differenzierung der Schwann-Zellen nach längerer Kultivierung bei 37°C. In diesem Rahmen bildet sich auch die Fähigkeit der Schwann-Zellen zur Myelinisierung von Neuronen wieder aus (Saavedra et al. 2008). Damit können die verwendeten Zellen als Schwann-Zellen mit der Kompetenz zur Myelinbildung angesehen werden.

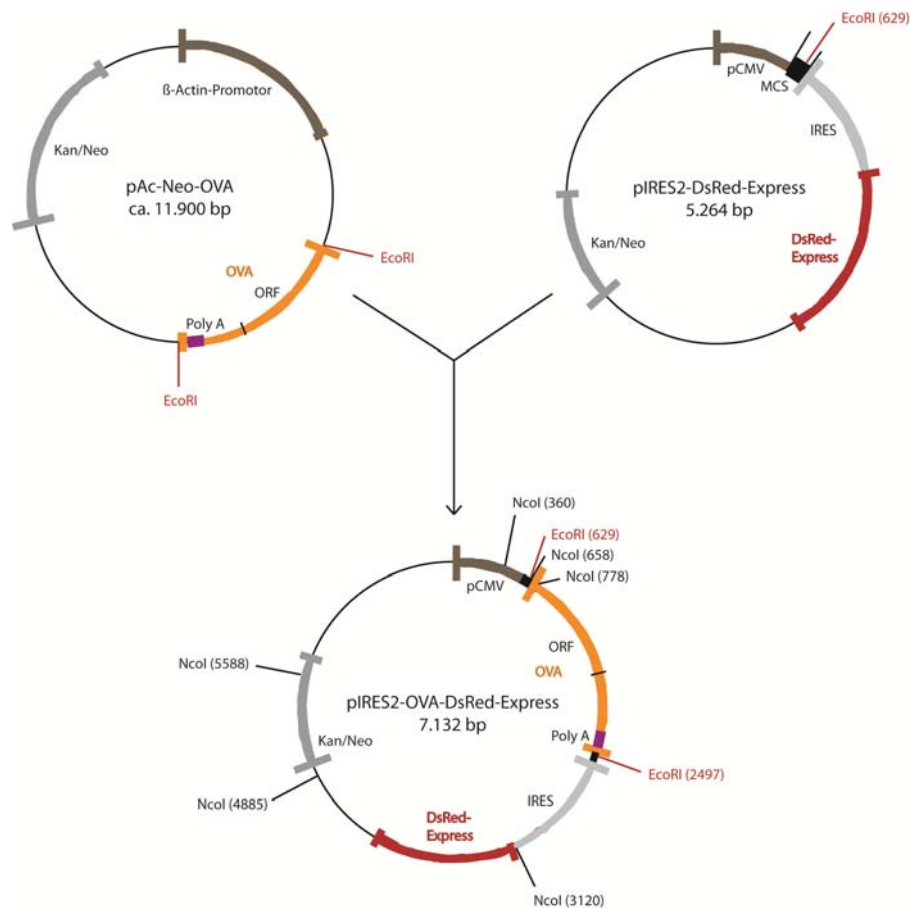
## 1.2 Generierung Ovalbumin exprimierender Schwann-Zellen

Die antigenen Eigenschaften des Proteins Ovalbumin, welches natürlicherweise in Zellen aus Hühnereileitern, nicht jedoch in Säugern vorkommt, und seiner immunogenen Oligopeptide der Aminosäuren 257-264 (Ova<sub>257-264</sub>) und 323-339 (Ova<sub>323-339</sub>) dienten in dieser Arbeit als Substrat für die Stimulation und Aktivierung von T-Zellen, die einen TCR als Transgen exprimieren, der für MHC-I- bzw. MHC-II-restringiertes Ovalbumin-Peptid spezifisch ist (OT-Zellen). Um die Präsentation endogen synthetisierten Proteins zu untersuchen, wurden Schwann-Zellen mit einer das Ovalbumin-Gen enthaltenden cDNA transfiziert und anschließend mit OT-Zellen kokultiviert.

### 1.2.1 Klonierung der Ovalbumin-cDNA aus pAC-Neo-OVA in pIRES2-DsRed-Express

Die vollständige Ovalbumin-cDNA wurde nach Amplifikation durch Restriktionsverdau mit EcoRI aus ihrem Ursprungsplasmid pAC-Neo-OVA (erhalten von Prof. H. Wiendl, Würzburg) isoliert und hinter den CMV-Promotor der ebenfalls mittels EcoRI-Verdau linearisierten Vektor-DNA (pIRES2-DsRed-Express) kloniert (Abb. 2).

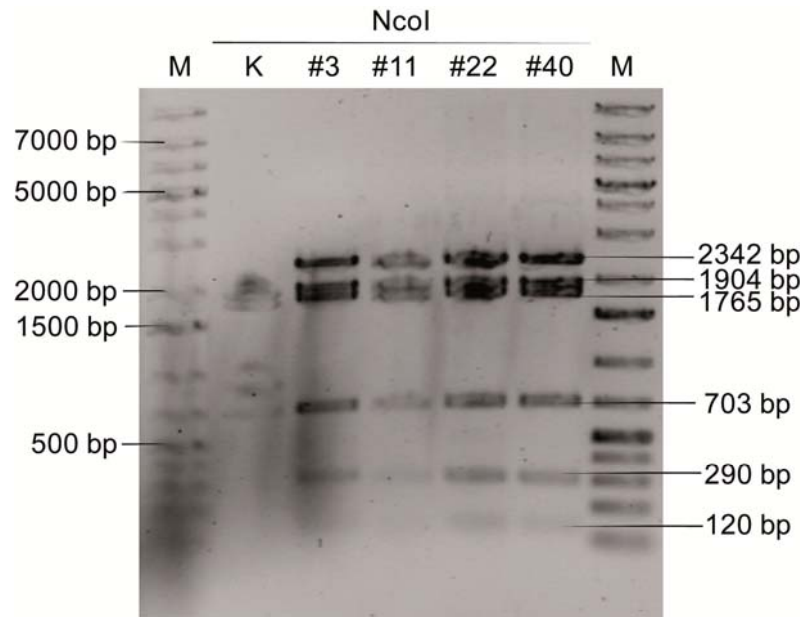
Da die Insert-DNA nach der Restriktion zwei identische Enden besaß, musste ihre korrekte Lage im Vektorplasmid nach der Ligation überprüft werden. Durch analytischen Restriktionsverdau mit NcoI ließ sich anhand des entstehenden DNA-Bandenmusters im Analysegele eine Anzahl von Proben mit korrekt ligiertem Vektorplasmid (pIRES2-OVA-DsRed-Express) identifizieren.



**Abb. 2: Klonierungsstrategie**

Die Ovalbumin-cDNA wurde durch EcoRI-Restriktionsverdau aus dem Ursprungsplasmid pAc-Neo-OVA isoliert. Der Vektor pIRES2-DsRed-Express wurde durch EcoRI-Restriktion linearisiert. Das Ovalbumin-Gen wurde anschließend hinter den CMV-Promotor des Vektors kloniert. Im klonierten Vektorplasmid sind neben den EcoRI- auch die NcoI-Schnittstellen eingezeichnet (Angaben in bp). (bp = Basenpaare, OVA = Ovalbumin-cDNA, ORF = open reading frame, Kan/Neo = Gen für Kanamycin-/Neomycinresistenz, pCMV = CMV-Promotor, MCS = multiple cloning site).

Abb. 3 zeigt die elektrophoretische Auftrennung von 4 positiven DNA-Proben (#3, #11, #22, #40) im Agarosegel nach Restriktionsverdau mit NcoI. Die Richtigkeit der Ligation lässt sich im Abgleich der DNA-Bandengrößen nach der Auftrennung (Abb. 3, Angaben rechts) mit der Lage der NcoI-Schnittstellen im klonierten Vektorplasmid (Abb. 2) verifizieren. Durch Retransformation ausgewählter positiver Proben und anschließende DNA-Großpräparation aus geschüttelten Übernachtskulturen konnten größere Mengen des klonierten Vektorplasmids gewonnen werden.



**Abb. 3: Analytischer Restriktionsverdau des Vektorplasmids mit NcoI**

Um die Korrektheit der Ligation zu überprüfen, wurden ausgewählte Proben ligierter DNA nach DNA-Schnellpräparation aus Bakterienübernachtskulturen durch analytischen Restriktionsverdau mit NcoI und elektrophoretische Auftrennung analysiert. Unter UV-Belichtung wird das DNA-Bandenmuster durch das interkalierte Ethidiumbromid im Agarosegel sichtbar. Die Zahlen rechts geben die jeweilige Größe der nach dem Verdau mit NcoI entstandenen DNA-Fragmente an, die Angaben links dienen als Orientierung am DNA-Größenmarker. Die rechnerisch anhand der Lage der NcoI-Schnittstellen im klonierten Vektorplasmid ermittelten Größen der DNA-Fragmente stimmen mit dem im Gel sichtbaren Bandenmuster überein. (bp = Basenpaare, M = Größenmarker, K = Kontrolle, #3, #11, #22, #40 = Proben klonierten Plasmids, Zahlen links = Größenangaben der DNA-Banden des Größenmarkers, Zahlen rechts = Größenangaben der DNA-Banden der Proben).

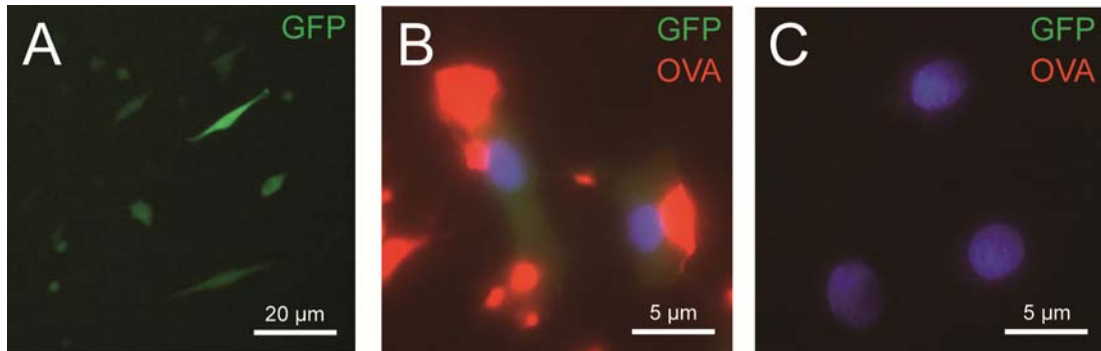
### 1.2.2 Nachweis von Ovalbumin in transfizierten Schwann-Zellen

Das klonierte Plasmid pIRES2-OVA-DsRed-Express wurde per Nukleofektion zusammen mit dem Kontrollvektor pmax-GFP in konditionell immortalisierte Schwann-Zellen transfiziert. Dank des Antibiotikaresistenzgens auf dem transfizierten Vektorplasmid konnte unter kontinuierlichem Selektionsdruck mit G418 eine stabil transfizierte Zellpopulation gewonnen und aufrechterhalten werden.

Abb. 4 stellt die Expression von GFP und Ovalbumin durch mit pIRES2-OVA-DsRed-Express und pmax-GFP transfizierte Schwann-Zellen dar. Die grüne Fluoreszenz des kotransfizierten GFP konnte in bis zu 50% der transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4, A) und war somit ein erster Beleg für den Erfolg der Transfektion. Ein rotes Fluoreszenzsignal als Ausdruck für die Transfektion und auch Transkription des das



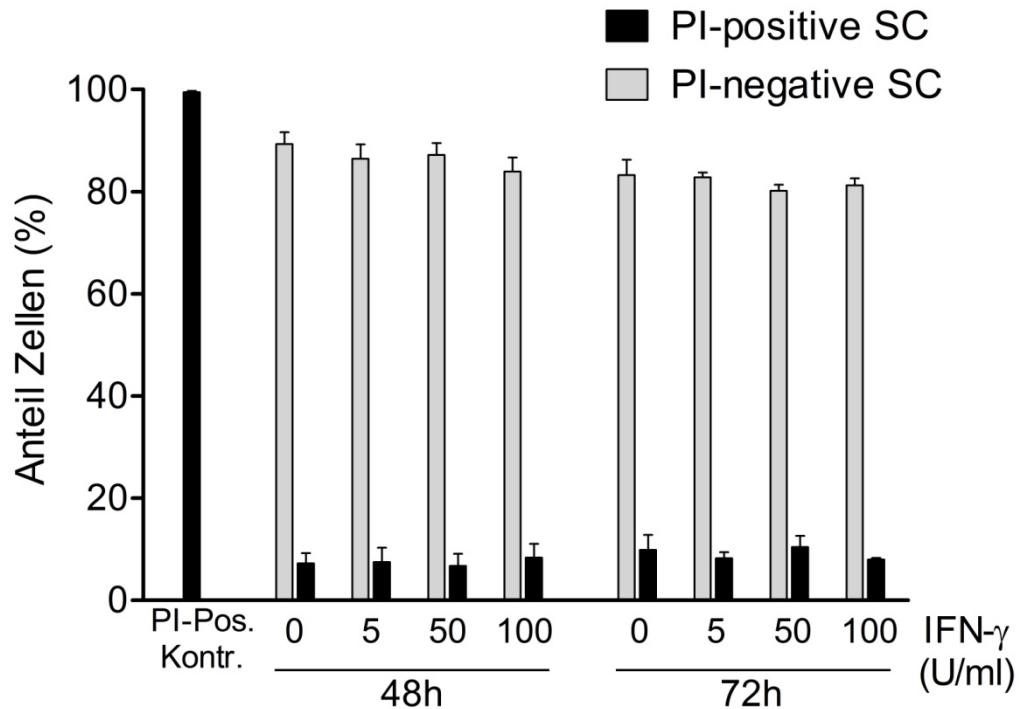
Ovalbumin-Gen tragenden Vektors konnte nicht beobachtet werden. Daher wurde in transfizierten Zellen das Ovalbumin durch immunzytochemische Anfärbung nachgewiesen (Abb. 4, B). Nicht transfizierte Zellen zeigten keine rote Fluoreszenz nach Ovalbuminfärbung (Abb. 4, C). Als funktioneller Beweis für die gelungene Transfektion konnte zudem die erfolgreiche Selektion resistenter Zellen mit G418 gelten.



**Abb. 4: Expression von Ovalbumin und GFP durch transfizierte Schwann-Zellen**

A – C. A: Transfizierte Schwann-Zellen wurden zunächst 24 Stunden nach Nukleofektion auf grüne Fluoreszenz durch GFP untersucht. Diese zeigte sich in bis zu 50% der transfizierten Zellen. B: Ovalbumin (rot) wurde in transfizierten Zellen durch immunzytochemische Färbung (Kaninchen- $\alpha$ -Huhn-Ovalbumin und Alexa Fluor 594- $\alpha$ -Kaninchen-IgG) nachgewiesen. Die simultane Grünfluoreszenz stammt von der gleichzeitigen GFP-Expression in transfizierten Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau). C: In nicht transfizierten Zellen wird weder GFP noch Ovalbumin exprimiert, daher sind nach identischer Färbung nur die Zellkerne (blau) zu sehen. (GFP = green fluorescent protein, OVA = Ovalbumin).

Um die unveränderte Vitalität der Schwann-Zellen nach der Transfektion sowie unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  zu bestätigen, wurden Schwann-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Prästimulation nach Zugabe von PI durchflusszytometrisch untersucht. Abb. 5 stellt die Ergebnisse als prozentualen Anteil PI-positiver (avitaler) und PI-negativer (vitaler) Schwann-Zellen nach 48 bzw. 72 Stunden unter Prästimulation mit verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (5, 50, 100 U/ml) dar. Die Zahlen beruhen auf dem Gating der PI-positiven und PI-negativen Zellpopulationen im FSC-vs.-PerCP-Plot, in welchem die PI-Färbung nachvollziehbar ist. Die Analyse ergab einen Anteil vitaler Schwann-Zellen von ca. 90% nach 48 Stunden sowie ca. 85% nach 72 Stunden, unabhängig von der IFN- $\gamma$ -Konzentration.



**Abb. 5: Vitalität der Schwann-Zellen nach Transfektion und IFN- $\gamma$ -Prästimulation**

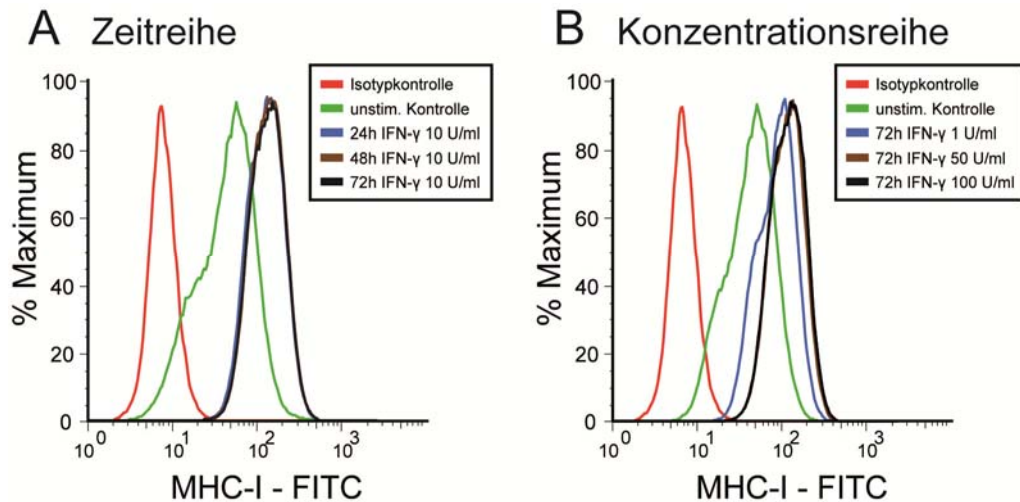
Transfizierte Schwann-Zellen wurden nach zweiwöchiger Differenzierung bei 37°C auf 48-Well-Kulturplatten ausgesät (ca. 10<sup>4</sup>/Well), für 48 bzw. 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen IFN- $\gamma$  (5, 50, 100 U/ml) prästimuliert und anschließend für eine durchflusszytometrische Analyse geerntet. Unmittelbar vor der Analyse wurde zu jeder Probe PI (Endkonzentration ca. 15 ng/ $\mu$ l) zugegeben und die Vitalität der Schwann-Zellen durch PI-positives bzw. PI-negatives Gating im FSC-vs.-PerCP-Plot ermittelt. Die Abbildung stellt die Prozentwerte vitaler (PI-negativer) und avitaler (PI-positiver) Schwann-Zellen nach 48 und 72 Stunden unter den entsprechenden IFN- $\gamma$ -Konzentrationen dar. Die Schwann-Zellen für die PI-Positivkontrolle wurden 30 Minuten mit 1% Triton X-100/BSA bei 37°C inkubiert, um die Zellen irreversibel zu zerstören. (SC = Schwann-Zellen, IFN- $\gamma$  = rekombinantes murines Interferon-gamma, PI = Propidiumiodid, FSC = forward scatter, PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, BSA = Bovines Serumalbumin).

### 1.3 MHC-Expressionsanalyse von Schwann-Zellen und BMDC

Der erste Schritt in der Analyse der Schwann-Zellen als APC galt dem Nachweis von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche. Differenzierte Schwann-Zellen wurden nach zweiwöchiger Kultivierung bei 37°C und Prästimulation mit verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen mit Antikörpern gegen MHC-I- und MHC-II-Moleküle gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

Bereits ohne vorherige Stimulation mit IFN- $\gamma$  zeigten die Zellen eine im Vergleich zur Isotypkontrolle (Abb. 6, rote Kurven) nachweisbare Menge von MHC-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche (Abb. 6, grüne Kurven). Schon geringe Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (10 U/ml) führten nach 24 Stunden zu einem sichtbaren Anstieg der MHC-I-Expression (Abb. 6 A,

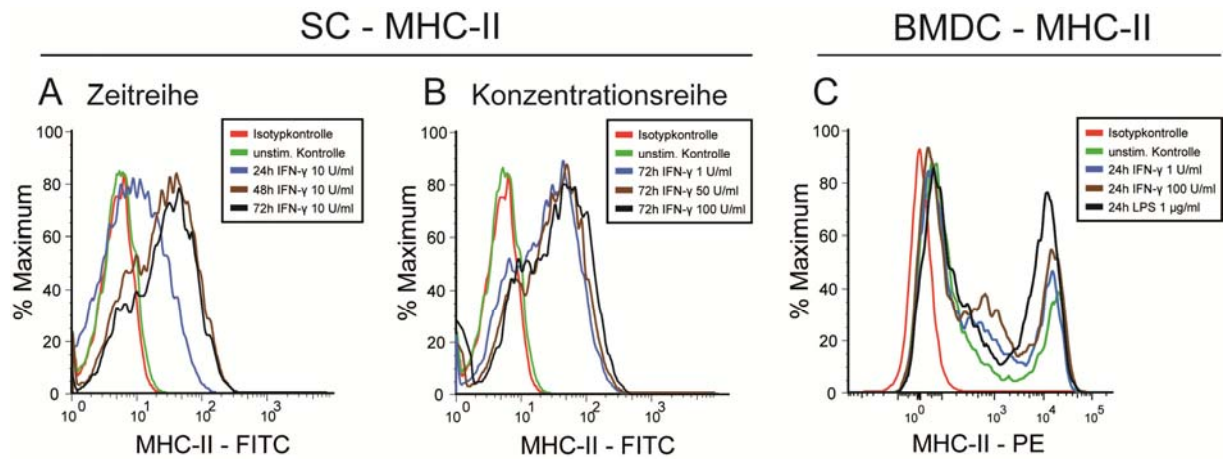
blaue Kurve), während diese sich sowohl durch eine verlängerte Dauer der Prästimulation (Abb. 6 A) als auch eine Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentration (Abb. 6 B) kaum noch weiter steigern ließ.



**Abb. 6: MHC-I-Expression auf Schwann-Zellen**

A, B. Schwann-Zellen wurden nach zweiwöchiger Kultivierung bei 37°C für 24 – 72 Stunden mit verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (1, 10, 50, 100 U/ml) prästimuliert. Die MHC-I-Expression wurde nach Färbung der Zellen mit einem FITC-gekoppelten  $\alpha$ -MHC-I-Antikörper (Klon KH95) durchflusszytometrisch analysiert. Die Menge der MHC-I-Moleküle auf der Schwann-Zell-Oberfläche ist jeweils als FITC-Histogramm dargestellt. A: MHC-I-Expression in Abhängigkeit von der Dauer (24, 48, 72 Stunden) der Prästimulation (10 U/ml IFN- $\gamma$ ). B: MHC-I-Expression nach 72 Stunden unter verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (1, 50, 100 U/ml). Die Isotypkontrollen sind in rot dargestellt. Es zeigt sich eine erkennbare basale MHC-I-Expression, welche unter der Wirkung von IFN- $\gamma$  bereits nach 24 Stunden deutlich zunimmt (A, B). Weder verlängerte Dauer der Prästimulation (A) noch erhöhte IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (B) führen zu einer weiteren Steigerung der MHC-I-Expression. (IFN- $\gamma$  = rekombinantes murines Interferon-gamma, FITC = Fluorescein-Isothiocyanat).

Auf unstimulierten Zellen fanden sich dagegen keine erkennbaren Mengen von MHC-II-Molekülen (Abb. 7 A, grüne Kurve), unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  (10 U/ml) konnte jedoch bereits nach 24 Stunden eine messbare MHC-II-Expression beobachtet werden (Abb. 7 A, blaue Kurve). Anders als bei den MHC-I-Molekülen führte die IFN- $\gamma$ -Einwirkung (10 U/ml) zu einer weiteren Steigerung der MHC-II-Expression nach 48 (Abb. 7 A, braune Kurve) und geringfügig auch nach 72 Stunden Prästimulation (Abb. 7 A, schwarze Kurve). Zudem führten bei langer Dauer der Prästimulation (72 Stunden) geringste Mengen sowie auch hohe Konzentrationen an IFN- $\gamma$  (1 – 100 U/ml) zu miteinander vergleichbaren, konstant hohen MHC-II-Syntheseraten (Abb. 7 B). Die Synthese von MHC-II-Molekülen wurde demnach, im Gegensatz zur MHC-I-Expression, erst durch Stimulation der Schwann-Zellen mit IFN- $\gamma$  induziert.



**Abb. 7: MHC-II-Expression auf Schwann-Zellen und BMDC**

A – C. Schwann-Zellen wurden nach der Differenzierung bei 37°C für 24 – 72 Stunden mit verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (1, 10, 50, 100 U/ml) inkubiert. BMDC wurden für 24 Stunden ebenfalls mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (1, 100 U/ml) und mit LPS (1  $\mu$ g/ml) prästimuliert. Nach Färbung mit einem FITC- (Schwann-Zellen) bzw. PE-gekoppelten (BMDC)  $\alpha$ -MHC-II-Antikörper (Klone 2G9 bzw. M5/114.15.2) wurde die MHC-II-Expression der Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Menge an MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche ist für die Schwann-Zellen jeweils als FITC-Histogramm und für die BMDC als PE-Histogramm dargestellt. A: IFN- $\gamma$ -Stimulation (10 U/ml) führt nach 24 Stunden zu nachweisbarer MHC-II-Expression gegenüber unstimulierten Zellen und einer weiteren Steigerung nach 48 bzw. geringfügig nach 72 Stunden. B: Nach 72 Stunden ist unter niedrigen (1 U/ml) wie hohen (100 U/ml) IFN- $\gamma$ -Konzentrationen eine etwa gleichstarke MHC-II-Expression zu beobachten. C: Bei BMDC ist nach 24 Stunden eine deutliche basale MHC-II-Expression zu beobachten, welche unter IFN- $\gamma$  (1, 100 U/ml) und stärker noch unter LPS (1  $\mu$ g/ml) zunimmt. (IFN- $\gamma$  = rekombinantes murines Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, SC = Schwann-Zellen, BMDC = bone marrow-derived dendritic cells (engl.), FITC = Fluorescein-Isothiocyanat, PE = Phycoerythrin).

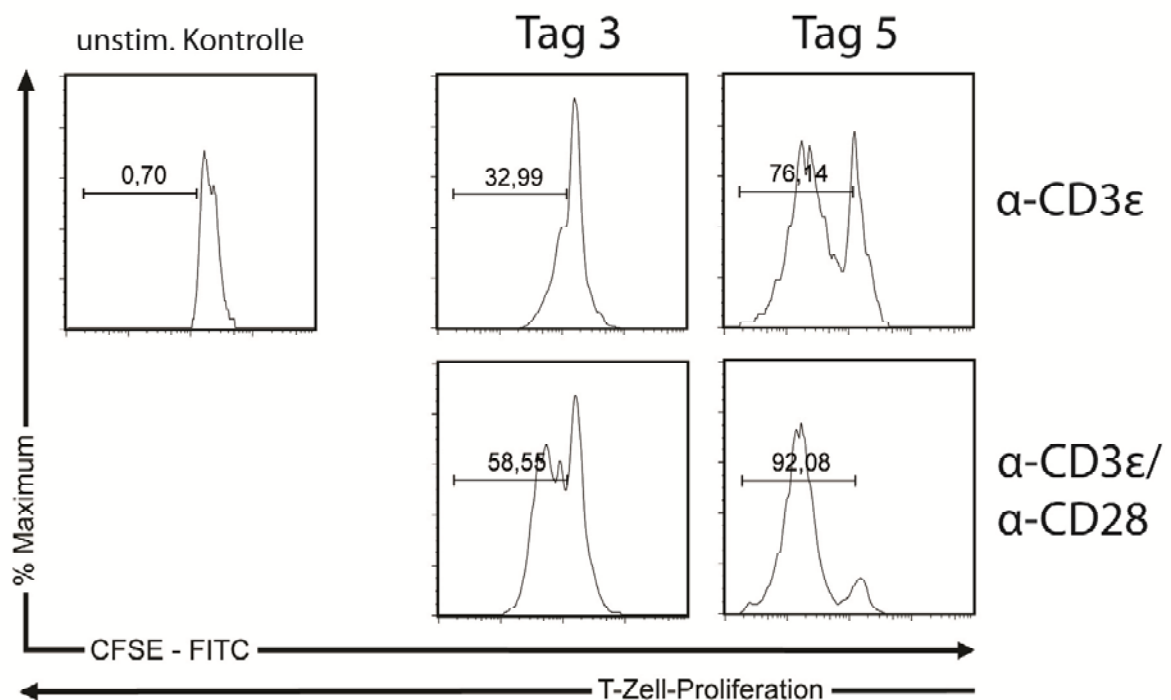
Zum Vergleich wurde auch die MHC-II-Expression von BMDC unter verschiedenen Stimulationsbedingungen analysiert. Dabei zeigte sich, dass bereits ohne Stimulation eine MHC-II-positive von einer negativen Population abgrenzbar ist. 24-stündige Prästimulation mit IFN- $\gamma$  führte zu einer geringen Steigerung der MHC-II-Expression bereits in niedrigen Konzentrationen (1 U/ml IFN- $\gamma$ , Abb. 7 C, blaue Kurve) und zu einem weiteren Anstieg unter höheren Konzentrationen (100 U/ml IFN- $\gamma$ , Abb. 7 C, braune Kurve). Die stärkste Expression von MHC-II-Molekülen konnte unter Stimulation der BMDC mit LPS (1  $\mu$ g/ml) beobachtet werden (Abb. 7 C, schwarze Kurve).

## 2 Analyse der Responderzellen

### 2.1 Durchflusszytometrische Messung der T-Zell-Proliferation

Im Rahmen der T-Zell-Stimulation kommt es durch spezifische TCR-MHC-Interaktionen zur Expansion eines für ein bestimmtes Antigen spezifischen T-Zell-Klons. Die nachfolgende Proliferation der T-Zellen wurde mithilfe eines CFSE-basierten Assays durchflusszytometrisch analysiert (siehe Methoden, 7.5.2).

Dies ist in einem Kontrolllexperiment anhand der antigenunspezifischen Proliferation aufgereinigter CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nachfolgend als OTII-Zellen bezeichnet, nach Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  sowie  $\alpha$ -CD28 beispielhaft zu sehen (Abb. 8).



**Abb. 8: Antigenunspezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  bzw.  $\alpha$ -CD28**

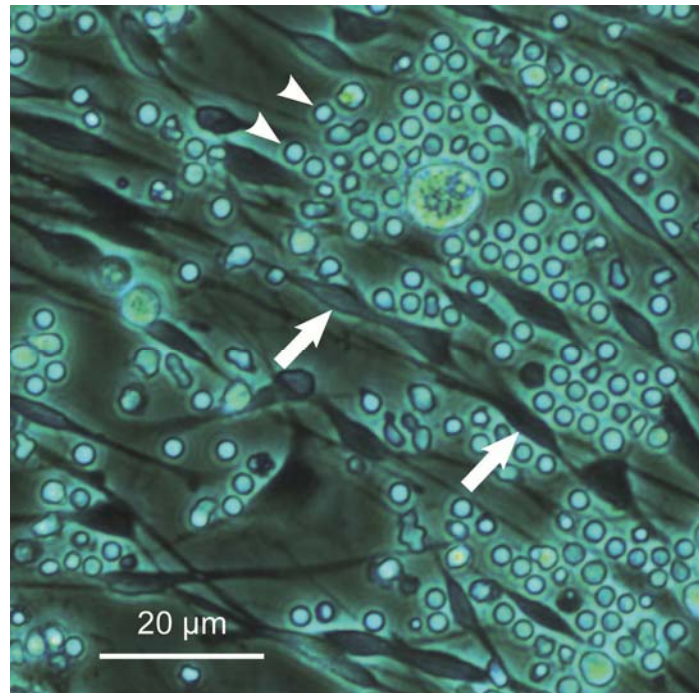
CFSE-gefärbte, aufgereinigte CD4<sup>+</sup> OTII-Zellen wurden für 3 und 5 Tage mit kulturplattengebundenem  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  (obere Reihe) und zum Teil zusätzlich mit löslichem  $\alpha$ -CD28 (untere Reihe) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit einem APC-gekoppelten  $\alpha$ -CD4-Antikörper (Klon RM4-5) gefärbt und nach CD4<sup>+</sup>-Gating hinsichtlich ihrer CFSE-Fluoreszenz durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellproliferation ist in Form von Histogrammen dargestellt und an der Abnahme der CFSE-Fluoreszenz abzulesen. Die Prozentzahlen geben dabei den Anteil der proliferierten Zellen an. Die Proliferation nach Stimulation allein mit  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  ist nach 3 Tagen marginal (33%) und steigt nach 5 Tagen auf 76% an (obere Reihe). Zusätzliche Stimulation mit  $\alpha$ -CD28 dagegen führt zur Zunahme der Proliferation auf 58% (Tag 3) bzw. 92% (Tag 5, untere Reihe). (CFSE = Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester, FITC = Fluorescein-Isothiocyanat, APC = Allophycocyanin).

Die CFSE-gefärbten OTII-Zellen wurden nach 3- und nach 5-tägiger Inkubation mit den oben genannten Antikörpern mit einem APC-konjugierten  $\alpha$ -CD4-Antikörper gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Prozentzahlen in Abb. 8 geben den Anteil proliferierter  $CD4^+$  T-Zellen nach  $CD4^+$ -Gating an. Die Stimulation des TCR durch kulturplattengebundenes  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  führte zu einer marginalen Proliferation von ca. 33% der OTII-Zellen nach 3 (Abb. 8, obere Reihe links) und ca. 76% nach 5 Tagen (Abb. 8, obere Reihe rechts) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 8, links oben). Bei zusätzlicher Anwesenheit von löslichem  $\alpha$ -CD28 führte die Bindung dieses Antikörpers an das kostimulatorische CD28-Molekül zu einem deutlichen Anstieg der Zellproliferation auf Werte von 58% (Tag 3; Abb. 8, untere Reihe links) bzw. 92% (Tag 5; Abb. 8, untere Reihe rechts) verglichen zu alleiniger Stimulation des TCR mit  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ . Nach 5 Tagen ist eine maximale Proliferation der OTII-Zellen unter der Prämisse vollständiger Aktivierung (d. h. Stimulation des TCR und von CD28) zu beobachten. Dieses Experiment demonstriert zum einen nochmals die Bedeutung kostimulatorischer Signale für die vollständige T-Zell-Aktivierung, zum anderen liefert es als Positivkontrolle Vergleichswerte für die Analyse der Schwann-Zell-induzierten antigenspezifischen T-Zell-Proliferation.

## 2.2 Schwann-Zell-induzierte Proliferation antigenspezifischer T-Zellen

Die Fähigkeit der Schwann-Zellen, antigenspezifische T-Zellen durch Antigenpräsentation auf MHC-Molekülen zu aktivieren, spiegelt sich im Ausmaß der resultierenden antigenspezifischen T-Zell-Proliferation wider.

CFSE-gefärbte OT-Zellen wurden für unterschiedliche Dauer mit Schwann-Zellen kokultiviert, welche zunächst mit IFN- $\gamma$  prästimuliert und anschließend mit unterschiedlichen Formen von antigenem Ovalbumin inkubiert worden waren. Abb. 9 zeigt einen repräsentativen lichtmikroskopischen Ausschnitt aus einer Kokultur von Schwann-Zellen (Pfeile) und OT-Zellen (Pfeilspitzen). Nach Entnahme wurden die OT-Zellen mit einem APC-gekoppelten  $\alpha$ -CD4- bzw.  $\alpha$ -CD8-Antikörper angefärbt und nach  $CD4^+$ - bzw.  $CD8^+$ -Gating hinsichtlich ihrer CFSE-Fluoreszenz durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellproliferation wurde wie oben beschrieben gemessen.



**Abb. 9: Schwann-Zell-Lymphozyten-Kokultur**

Schwann-Zellen und OT-Zellen wurden in 48-Well-Kulturplatten kokultiviert und lichtmikroskopisch beobachtet. Der Ausschnitt zeigt konditionell immortalisierte, ausdifferenzierte Schwann-Zellen (Pfeile) und die clusterartig an diese angelagerten OT-Zellen (Pfeilspitzen). Eine Schädigung von Schwann-Zellen oder OT-Zellen durch zytotoxische Interaktionen ist nicht erkennbar.

Zunächst sollen die Ergebnisse der Kokulturrexperimente mit den OTI-Zellen dargestellt werden. Anschließend folgen die entsprechenden Resultate für die OTII-Zellen. Im Text aufgeführte Werte entsprechen nicht den Zahlen in den Quadranten der Abbildungen (Abb. 10 und 12). Dies kommt dadurch zustande, dass die Prozentzahlen in den Quadranten sich auf die Gesamtheit aller Zellen aus dem Gate der vitalen Lymphozyten beziehen, also auch CD8<sup>+</sup> bzw. CD4-negative Zellen mit einschließen. Die Werte im Text beruhen dagegen auf der Analyse ausschließlich CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen, welche nach entsprechendem CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Gating hinsichtlich ihrer CFSE-Fluoreszenz untersucht wurden. Sie geben damit die antigenspezifische Proliferation dieser Zellen als prozentualen Anteil aller analysierten CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen genau wieder. Einige dieser Werte sind in den Analysen des zeitlichen Verlaufs der T-Zell-Reaktion wiederzufinden (Abb. 11 und 13). Zudem stellt Abb. 14 die Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einer Gesamtauswertung vergleichend dar und orientiert sich dabei an diesen tatsächlich relevanten Werten.

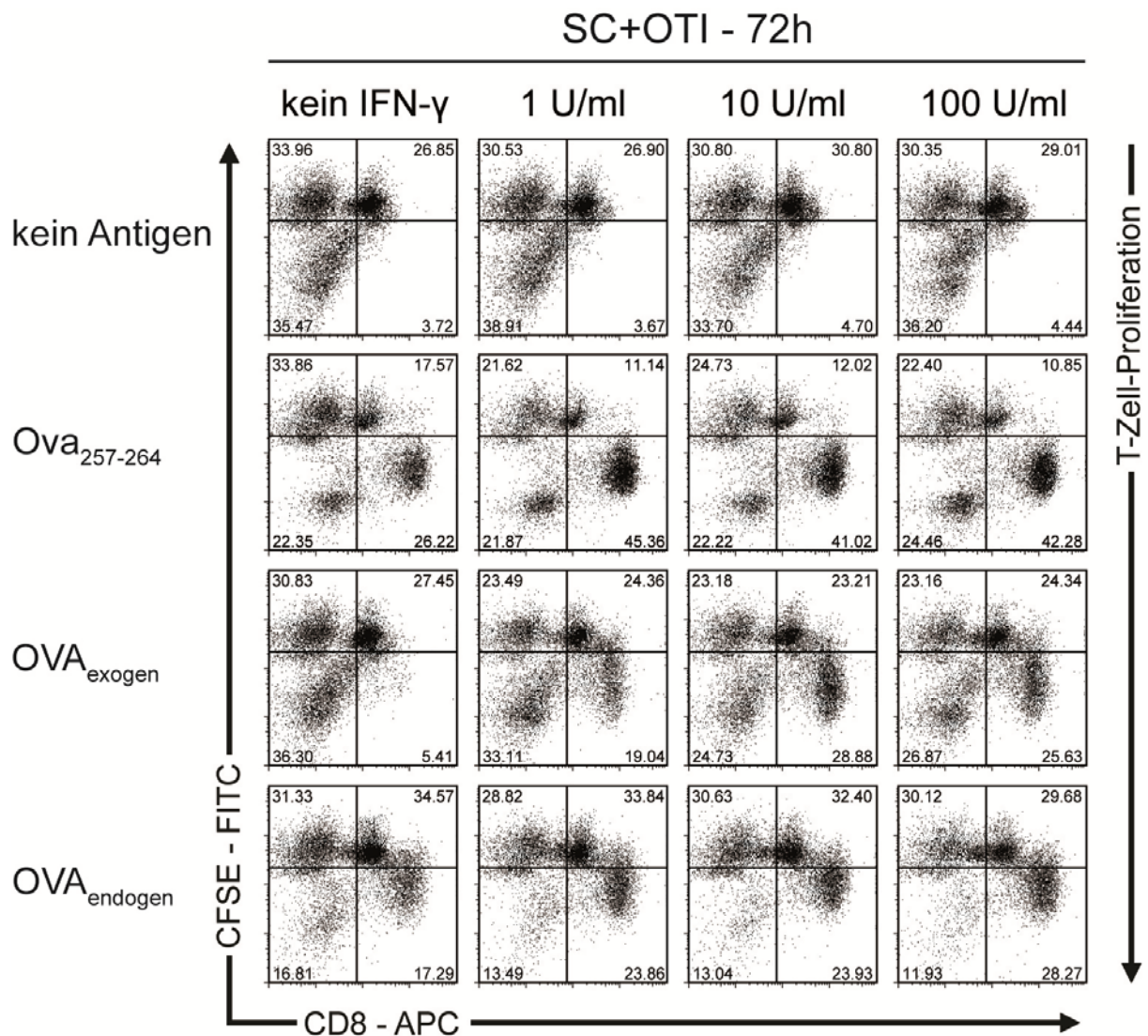
### 2.2.1 Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Schwann-Zellen via MHC-I-Präsentation

Zur Untersuchung der Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden OTI-Zellen und Schwann-Zellen für 72 Stunden kokultiviert und die OTI-Zellen anschließend zur durchflusszytometrischen Analyse entnommen. Durch doppeltes Gating einerseits aller vitalen, PI-negativen Zellen sowie andererseits speziell der Lymphozytenpopulation wurden avitale sowie nicht lymphatische Zellen weitestgehend von der Analyse ausgeschlossen. Abb. 10 stellt die analysierten OTI-Zellen aus dem Gate der vitalen Lymphozyten in CFSE-vs.-CD8-Plots dar. Die Abnahme der CFSE-Fluoreszenz als Ausdruck der Zellproliferation ist an der Verschiebung der Punktwolken in den jeweils rechten Quadranten entlang der Y-Achse zu erkennen.

Bei Fehlen von Antigen kam es zu keiner nennenswerten Proliferation der OTI-Zellen nach 72 Stunden (Abb. 10, obere Reihe), während sich nach Zugabe von 10 µM Ova<sub>257-264</sub> bereits ohne Stimulation mit IFN-γ eine Proliferation von ca. 65% der Zellen zeigte, welche unter IFN-γ-Wirkung auf ca. 80% zunahm (Abb. 10, zweite Reihe). Wurde Ovalbumin als ganzes Protein exogen zugeführt, proliferierten die OTI-Zellen erst nach zusätzlicher vorheriger IFN-γ-Stimulation der Schwann-Zellen (Abb. 10, dritte Reihe), wobei höhere IFN-γ-Konzentrationen auch zu einem erhöhten Anteil proliferierter Zellen führten (44% bei Prästimulation mit 1 U/ml IFN-γ, 55% bei 10 U/ml IFN-γ). Ovalbumin exprimierende Schwann-Zellen waren dagegen auch ohne Prästimulation in der Lage, eine Proliferation von etwa 35% der OTI-Zellen zu induzieren, auch hier konnte unter steigender IFN-γ-Konzentration eine Zunahme des Anteils der proliferierten Zellen auf über 45 % verzeichnet werden (Abb. 10, unterste Reihe). Desweiteren deutet die Rechtsverschiebung des APC-Signals proliferierter Zellen daraufhin, dass die CD8-Expression proliferierender Zellen gegenüber derer ruhender Zellen zunimmt (Abb. 10, untere drei Reihen).

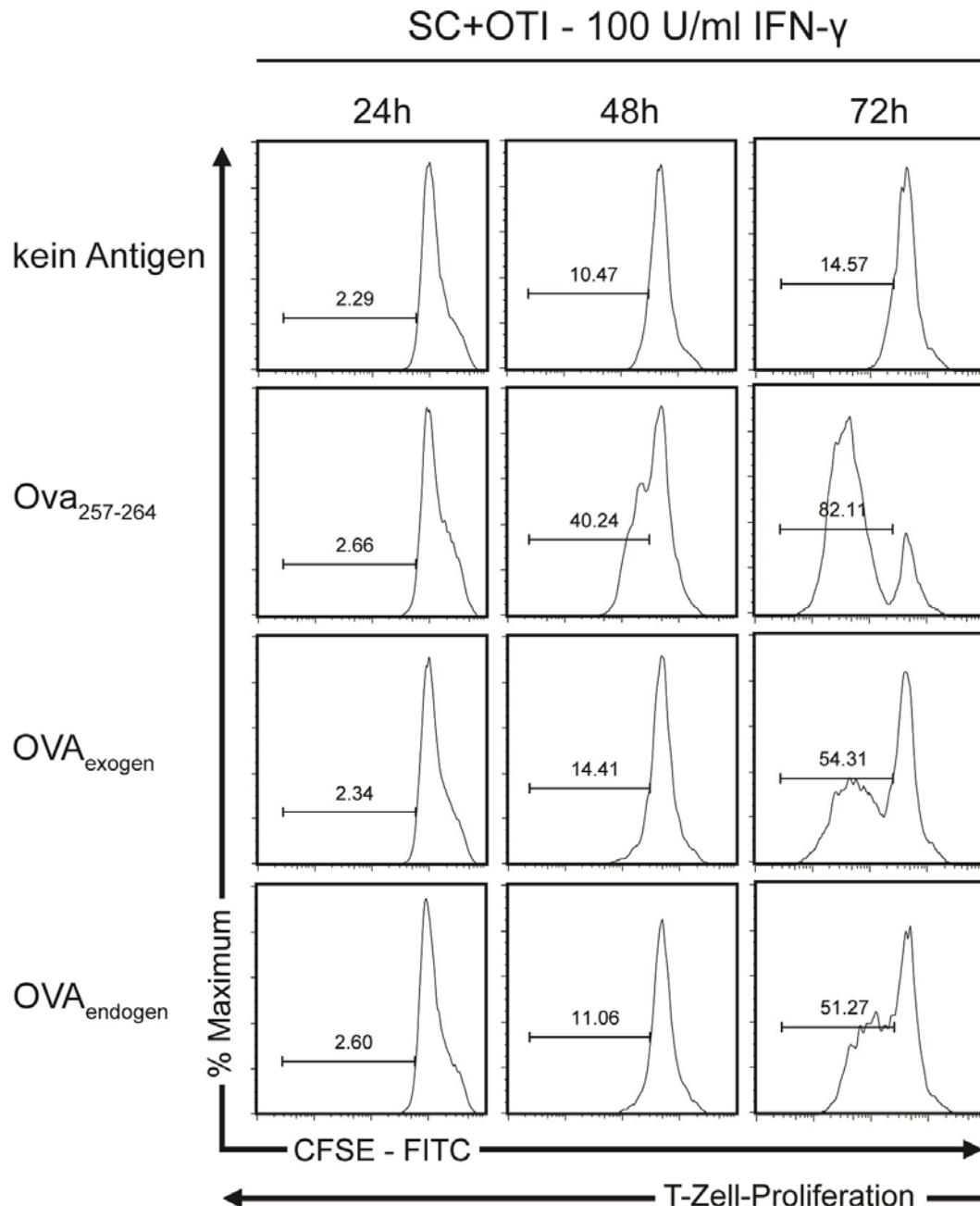
In weiteren Analysen konnte auch der zeitliche Verlauf der CD8<sup>+</sup>-Zell-Reaktion dargestellt werden (Abb. 11). Dabei wurden durch vorheriges CD8<sup>+</sup>-Gating nur CD8<sup>+</sup> Zellen in die Analyse mit einbezogen. Die T-Zell-Proliferation ist an den Prozentzahlen in den CFSE-Histogrammen abzulesen. Kokulturen mit Ova<sub>257-264</sub> zeigten bereits nach 48 Stunden eine Proliferation der OTI-Zellen von ca. 40%, welche nach 72 Stunden Werte von über 80% erreichte (Abb. 11, zweite Reihe). Bei Stimulation mit exogenem Ovalbumin-Protein war eine deutliche OTI-Zell-Proliferation erst nach 72 Stunden sichtbar, ebenso in der Kokultur mit Ovalbumin exprimierenden Schwann-Zellen. In beiden Fällen konnte ein Anteil von ca. 50% proliferierter Zellen beobachtet werden (Abb. 11, rechte Spalte unten).





**Abb. 10: Schwann-Zell-induzierte Proliferation von CD8<sup>+</sup> OTI-Zellen**

CFSE-gefärbte OTI-Zellen wurden nach 72-stündiger Kokultur mit Schwann-Zellen unter verschiedenen prästimulatorischen Bedingungen mit einem APC-konjugierten  $\alpha$ -CD8-Antikörper (Klon 53-6.7) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Alteration der CFSE-Fluoreszenzsignale in den jeweils rechten Quadranten der einzelnen Quadrate ist ein Maß für die T-Zell-Proliferation. Obere Reihe: In Abwesenheit von Antigen kann keine Proliferation der OTI-Zellen beobachtet werden. Zweite Reihe: In Kokulturen mit Ova<sub>257-264</sub> zeigte sich eine deutliche Proliferation unter unstimulierten Bedingungen und noch ausgeprägter nach vorheriger IFN- $\gamma$ -Stimulation der Schwann-Zellen. Dritte Reihe: Bei Zugabe von Ovalbumin als exogenem Protein war nur eine Stimulation der OTI-Zellen durch zuvor stimulierte Schwann-Zellen zu beobachten. Unterste Reihe: Durch Schwann-Zellen endogen synthetisiertes Ovalbumin führte zwar auch ohne, jedoch deutlicher nach vorheriger IFN- $\gamma$ -Stimulation zur Proliferation der OTI-Zellen. (SC = Schwann-Zellen, IFN- $\gamma$  = rekombinantes murines Interferon-gamma, Ova<sub>257-264</sub> = Ovalbumin-Peptid der Aminosäuren 257-264, OVA<sub>exogen</sub> = exogenes vollständiges Ovalbumin-Protein, OVA<sub>endogen</sub> = endogen synthetisiertes vollständiges Ovalbumin-Protein, CFSE = Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester, APC = Allophycocyanin, FITC = Fluorescein-Isothiocyanat).



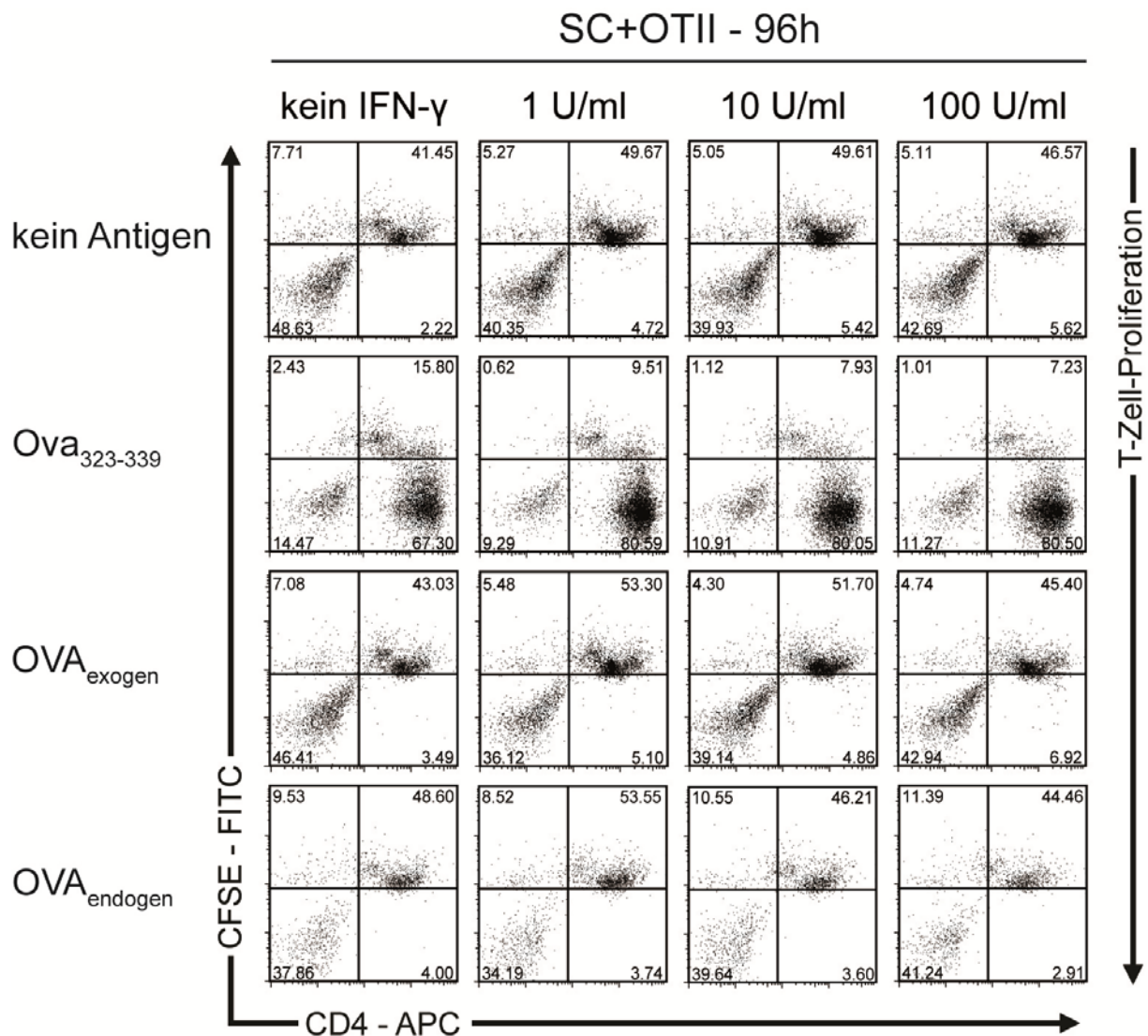
**Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der OTI-Zell-Proliferation nach Kokultivierung mit Schwann-Zellen**

OTI-Zellen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten der Kokultur entnommen, mit einem APC-konjugierten  $\alpha$ -CD8-Antikörper (Klon 53-6.7) gefärbt und nach CD8<sup>+</sup>-Gating hinsichtlich ihrer CFSE-Fluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert. In einer Zeile ist jeweils die beobachtete Zellproliferation zu den verschiedenen Analysezeitpunkten als CFSE-Histogramm abgebildet. Die Schwann-Zellen wurden zuvor alle mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  prästimuliert. Obere Reihe: Kokulturen ohne Antigen führten zu keiner Proliferation. Zweite Reihe: Bei Zugabe von Ova<sub>257-264</sub> zeigte sich eine mäßige Proliferation OTI-Zellen nach 48 Stunden (mittleres Bild) und eine ausgeprägte Proliferation nach 72 Stunden (rechtes Bild). Dritte Reihe: Zugabe von exogenem Ovalbumin-Protein führte nach 72 Stunden zu einer Proliferation von ca. 50% der OTI-Zellen (rechtes Bild). Unterste Reihe: von Schwann-Zellen endogen synthetisiertes Ovalbumin induzierte ebenfalls eine nach 72 Stunden nachweisbare Proliferation von ca. 50% der OTI-Zellen (rechtes Bild). (SC = Schwann-Zellen, IFN- $\gamma$  = rekombinantes murines Interferon-gamma, Ova<sub>257-264</sub> = Ovalbumin-Peptid der Aminosäuren 257-264, OVA<sub>exogen</sub> = exogenes vollständiges Ovalbumin-Protein, OVA<sub>endogen</sub> = endogen synthetisiertes vollständiges Ovalbumin-Protein, CFSE = Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester, APC = Allophycocyanin, FITC = Fluorescein-Isothiocyanat).

### 2.2.2 Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Schwann-Zellen via MHC-II-Präsentation

Vor dem Hintergrund des oben dargestellten Nachweises von mengenmäßig relevanter MHC-II-Expression auf Schwann-Zellen (siehe 1.3) interessierte nun vor allem die Frage, ob diese MHC-II-Moleküle auch mit Antigen beladen werden und eine Aktivierung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen hervorrufen können. Die CD4<sup>+</sup>-Zell-Antwort wurde analog zu den Experimenten mit den OTI-Zellen durch Kokultivierung von Schwann-Zellen mit OTII-Zellen analysiert. Der Begriff OTII-Zellen wird hier für aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Die Kokultivierung der Schwann-Zellen mit speziell aufgereinigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde deshalb durchgeführt, da so ein möglicher Einfluss im Pool der Milzzellen enthaltener professioneller APC auf die Proliferation der OTII-Zellen ausgeschlossen werden konnte. Vorexperimente hatten eine Verzögerung der OTII-Zell-Reaktion um bis zu 24 Stunden verglichen mit den OTI-Zellen gezeigt, daher erfolgte hier die Kultivierung für 96 Stunden. Da die Präsentation exogenen Antigens auf MHC-II-Molekülen eigentlich eine spezielle Funktion von professionellen APC darstellt, wurde diese Fähigkeit der Schwann-Zellen im direkten Vergleich mit der Antigenpräsentation durch BMDC – als Vertreter der professionellen APC – untersucht.

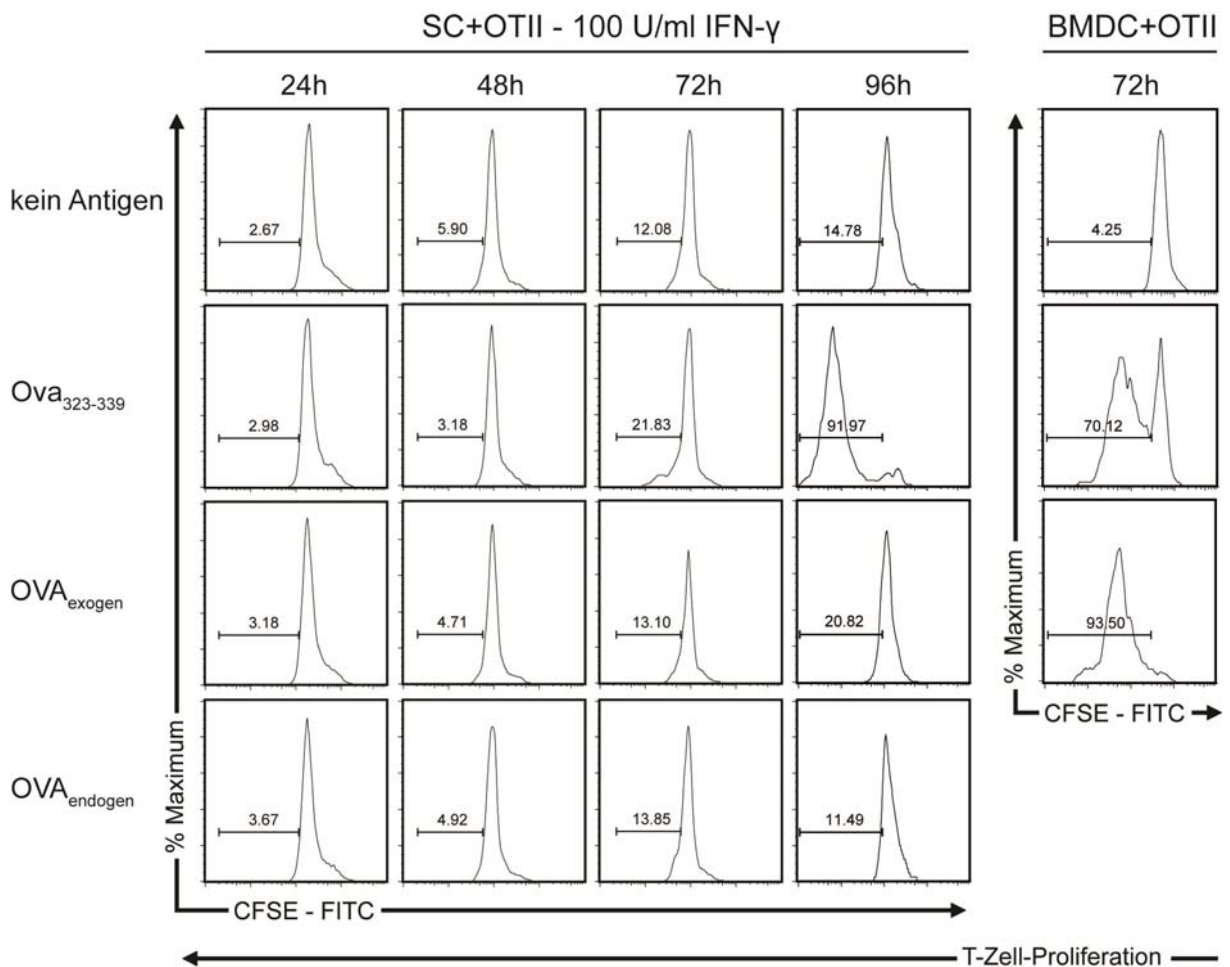
Nach 96-stündiger Kokultivierung ohne Antigen blieb auch bei den OTII-Zellen selbst in Gegenwart IFN- $\gamma$ -stimulierter Schwann-Zellen eine erkennbare Proliferation aus (Abb. 12, obere Reihe). Dagegen konnten unstimulierte Schwann-Zellen in Anwesenheit von Ova<sub>323-339</sub> bereits ohne IFN- $\gamma$  mehr als 80% der OTII-Zellen zur Proliferation anregen, unter IFN- $\gamma$ -Stimulation stieg dieser Anteil auf über 90% an (Abb. 12, zweite Reihe). Sowohl Zugabe von exogenem Ovalbumin-Protein (Abb. 12, dritte Reihe) als auch durch transfizierte Schwann-Zellen endogen synthetisiertes Ovalbumin (Abb. 12, unterste Reihe) führten sogar unter hohen Konzentrationen von IFN- $\gamma$  zu keiner nachweisbaren Proliferation der OTII-Zellen.



**Abb. 12: Schwann-Zell-induzierte Proliferation von CD4<sup>+</sup> OTII-Zellen**

Die Kultivierung und Analyse erfolgte entsprechend den Experimenten mit den OTI-Zellen. Im Gegensatz dazu wurden hier durch MACS aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nachfolgend OTII-Zellen genannt, mit Schwann-Zellen kokultiviert. Wegen der verzögerten Antwort der OTII-Zellen wurden diese erst nach 96 Stunden zur FACS-Analyse entnommen. Obere Reihe: In Abwesenheit von Antigen zeigte sich keine Proliferation der OTII-Zellen. Zweite Reihe: Nach Zugabe von Ova<sub>323-339</sub> konnte eine starke Proliferation bereits unter unstimulierten Bedingungen, jedoch noch ausgeprägter nach vorheriger IFN- $\gamma$ -Stimulation der Schwann-Zellen beobachtet werden. Dritte und vierte Reihe: Sowohl nach Zugabe von Ovalbumin als exogenem Protein als auch in Anwesenheit Ovalbumin exprimierender Schwann-Zellen kam es auch unter IFN- $\gamma$ -Stimulation der Schwann-Zellen zu keiner erkennbaren OTII-Zell-Proliferation. (SC = Schwann-Zellen, IFN- $\gamma$  = rekombinantes murines Interferon-gamma, Ova<sub>323-339</sub> = Ovalbumin-Peptid der Aminosäuren 323-339, OVA<sub>exogen</sub> = exogenes vollständiges Ovalbumin-Protein, OVA<sub>endogen</sub> = endogen synthetisiertes vollständiges Ovalbumin-Protein, CFSE = Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester, APC = Allophycocyanin, FITC = Fluorescein-Isothiocyanat).

Betrachtet man die Analyse des zeitlichen Ablaufes der CD4<sup>+</sup>-Zell-Antwort, zeigt sich, dass eine Proliferation der OTII-Zellen bei Vorhandensein von Ova<sub>323-339</sub> nach 72 Stunden erstmalig nachweisbar war (knapp 22%) und nach 96 Stunden nahezu ihr Maximum (über 90%) erreichte (Abb. 13, zweite Reihe).

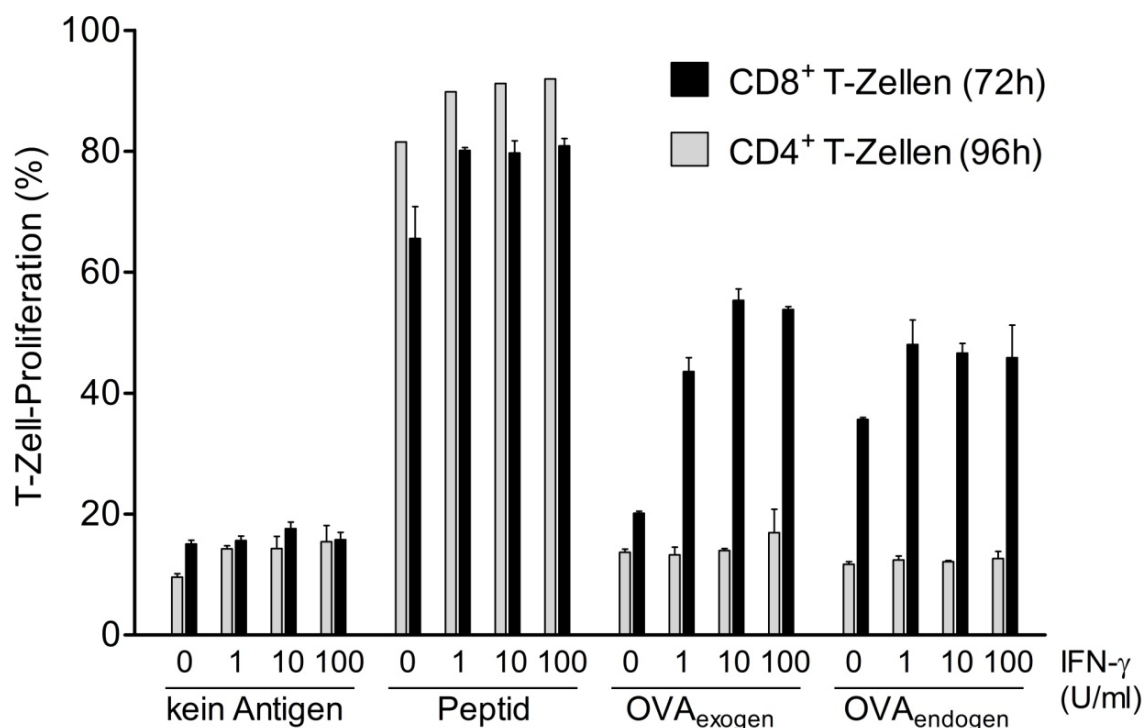


**Abb. 13: Zeitlicher Verlauf Schwann-Zell-induzierter und BMDC-induzierter OTII-Zell-Proliferation**

Aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nachfolgend OTII-Zellen genannt, wurden für unterschiedlich lange Dauer mit Schwann-Zellen (erste vier Spalten) und BMDC (rechte Spalte) kokultiviert und die Zellproliferation der OTII-Zellen nach  $\alpha$ -CD4-Färbung (Klon RM4-5) und CD4<sup>+</sup>-Gating durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildung gibt die Zellproliferation analog zu den Ergebnissen für die OTI-Zellen jeweils als CFSE-Histogramm wieder. Die Schwann-Zellen wurden zuvor alle mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  prästimuliert. Obere Reihe: Ohne Antigen zeigte sich weder eine Schwann-Zell- noch eine BMDC-induzierte Proliferation. Zweite Reihe: In Anwesenheit von Ova<sub>323-339</sub> zeigten die OTII-Zellen nach Kokultivierung mit Schwann-Zellen eine marginale Proliferation nach 72 Stunden (drittes Bild von links) und eine ausgeprägte Proliferation nach 96 Stunden (viertes Bild von links). Kokultivierung mit BMDC führte bereits nach 72 Stunden zu einer deutlichen OTII-Zell-Proliferation (rechtes Bild). Dritte Reihe: Zugabe von exogenem Ovalbumin-Protein führte nach 72 Stunden zu einer starken OTII-Zell-Proliferation in der Kokultur mit BMDC, während Kokulturen mit Schwann-Zellen auch nach 96 Stunden keine erkennbare Proliferation zeigten. Unterste Reihe: Auch die Anwesenheit Ovalbumin exprimierender Schwann-Zellen löste keine Proliferation aus. (SC = Schwann-Zellen, BMDC = bone marrow-derived dendritic cells (engl.), IFN- $\gamma$  = rekombinantes murines Interferon-gamma, Ova<sub>323-339</sub> = Ovalbumin-Peptid der Aminosäuren 323-339, OVA<sub>exogen</sub> = exogenes vollständiges Ovalbumin-Protein, OVA<sub>endogen</sub> = endogen synthetisiertes vollständiges Ovalbumin-Protein, CFSE = Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester, APC = Allophycocyanin, FITC = Fluorescein-Isothiocyanat).

In analog durchgeführten Kokulturrexperimenten mit BMDC und OTII-Zellen konnte ebenfalls ohne Antigen keine Proliferation der OTII-Zellen gemessen werden. Jedoch führte der Zusatz von Ova<sub>323-339</sub> bereits nach 72 Stunden zu einem Anteil proliferierter Zellen von 70%, unter Inkubation mit Ovalbumin als exogenem Protein konnten Werte von 93% nach 72

Stunden nachgewiesen werden (Abb. 13, rechte Spalte). Schwann-Zellen konnten dagegen unter Zugabe von exogenem Ovalbumin-Protein keine Proliferation der OTII-Zellen auslösen, auch wenn die 96-Stunden-Werte im direkten Vergleich zu antigenfreien Kokulturen eine gewisse Zellproliferation suggerieren (20,8% vs. 14,8%, Abb. 13, vierte Spalte, erstes und drittes Bild). Dennoch ist eine regelrechte Abnahme des FITC-Fluoreszenzsignals als Ausdruck der CFSE-Verdünnung infolge von Zellteilung nicht zu verzeichnen – im Gegensatz zu der ausgeprägten BMDC-induzierten Zellproliferation. Kokultivierung mit Ovalbumin exprimierenden Schwann-Zellen führte ebenfalls zu keiner Proliferation der OTII-Zellen (Abb. 13, unterste Reihe). Abschließend lässt sich festhalten, dass die T-Zell-Proliferation nach Kokultivierung der OTII-Zellen mit den BMDC nicht nur ca. 24 Stunden früher erfolgte, sondern auch deutlich ausgeprägter als nach Kokultivierung mit Schwann-Zellen.



**Abb. 14: Schwann-Zell-induzierte CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zell-Proliferation im Vergleich**

Das Diagramm zeigt die Proliferation CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter jeweils gleichen Kulturbedingungen. 4 Balkenpaare kennzeichnen jeweils von links nach rechts die Proliferation beider Zelltypen nach Kokultivierung mit unstimulierten, sowie mit 1, 10 und 100 U/ml IFN- $\gamma$  prästimulierten Schwann-Zellen und in Anwesenheit des untenstehenden Antigens. Eine Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Schwann-Zellen erfolgte nur in Anwesenheit von Ova<sub>323-339</sub>, während CD8<sup>+</sup> T-Zellen zusätzlich durch exogenes sowie endogenes Ovalbumin-Protein stimuliert wurden. (IFN- $\gamma$  = rekombinantes murines Interferon-gamma, Peptid = Ovalbumin-Peptid der Aminosäuren 257-264 (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) bzw. 323-339 (CD4<sup>+</sup> T-Zellen), OVA<sub>exogen</sub> = exogenes vollständiges Ovalbumin-Protein, OVA<sub>endogen</sub> = endogen synthetisiertes vollständiges Ovalbumin-Protein).

Betrachtet man die Gesamtauswertung (Abb. 14), wird noch einmal deutlich, dass  $CD4^+$  T-Zellen in relevantem Maß nur durch das MHC-II-restringierte Peptid Ova<sub>323-339</sub> stimuliert wurden, wobei auch eine leichte Abhängigkeit von der IFN- $\gamma$ -Konzentration erkennbar ist. In der Analyse der  $CD8^+$  T-Zellen zeigt sich – abgesehen von antigenfreien Kulturen – ein deutlicher Unterschied im Ausmaß der Zellproliferation unter Kokultivierung mit unstimulierten Schwann-Zellen gegenüber Prästimulation mit IFN- $\gamma$ . Darüber hinaus ist allerdings eine relevante Abhängigkeit der T-Zell-Proliferation von der IFN- $\gamma$ -Konzentration nur bei Stimulation der  $CD8^+$  Zellen mit exogenem Ovalbumin-Protein zu beobachten.

## **IV Diskussion**

### **1 Kritische Bewertung des Kokulturmodells**

Die experimentelle Nachahmung komplexer Vorgänge wie den zellulären Interaktionen zwischen Schwann-Zellen und T-Lymphozyten im entzündlichen Milieu einer inflammatorischen Neuropathie stellt hohe Ansprüche an ein entsprechendes *in-vitro*-Modell. Trotz Berücksichtigung aller Fehlerquellen eines solchen Modells lassen sich einige Schwachstellen in der Durchführung dieser Experimente nicht gänzlich beseitigen. Diese Faktoren sollen im Folgenden einer kritischen Bewertung unterzogen werden. Vor diesem Hintergrund müssen auch die beobachteten Effekte stets kritisch beurteilt werden.

#### **1.1 Konditionell immortalisierte Schwann-Zellen als in-vitro-Modell myelinkompetenter Schwann-Zellen**

Murine Schwann-Zellen stabil und langfristig zu kultivieren, ist seit jeher eine große Herausforderung. Speziell die Überwucherung der Kulturen mit nach der Isolierung der Schwann-Zellen aus dem Nervengewebe verbliebenen Fibroblasten wurde mehrfach beschrieben (Jin et al. 2008; Wei et al. 2009). Zudem stellt insbesondere die Züchtung stabil transfizierter Schwann-Zellen erfahrungsgemäß ein großes Problem dar.

Durch die Entwicklung konditionell immortalisierter Schwann-Zellen, welche zur temperaturabhängigen Veränderung ihres Differenzierungszustandes fähig sind, konnten einige der grundlegenden Schwierigkeiten bei der Kultur muriner Schwann-Zellen umgangen werden. Das bei 33°C und Zugabe von IFN- $\gamma$  nahezu ungehemmte Wachstum der konditionell immortalisierten Zellen ermöglicht eine problemlose Expansion ohne Fibroblastenproliferation. Auch die Transfektion der Zellen und die Selektion transfizierter Zellen können unter diesen Kulturbedingungen ohne Schwierigkeiten erfolgen.

Dagegen wird durch eine Umgebungstemperatur von 37°C die Differenzierung der Zellen gefördert, so dass sie ihre typischen Charakteristika wieder voll ausbilden und insbesondere ihre speziellste Eigenschaft, nämlich die Fähigkeit zur Myelinbildung, wiedererlangen (Saavedra et al. 2008). Mit der auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Expression typischer Schwann-Zell-Marker besitzen die für die Kokulturrexperimente verwendeten Zellen eindeutige Merkmale der Schwann-Zell-Differenzierung. Durch diesen Umstand kommt das



hier angewandte *in-vitro*-Modell der Interaktion zwischen Schwann-Zellen und T-Lymphozyten den Verhältnissen *in vivo* näher als Experimente mit nicht primären Zelllinien (Bonetti et al. 2003). Diese Tatsache unterstreicht die funktionelle Relevanz der Resultate.

## 1.2 Störfaktoren seitens der Responderzellen

Die Untersuchung der Fähigkeit von Schwann-Zellen zur Antigenpräsentation kann nur valide Ergebnisse liefern, wenn ein möglicher, störender Einfluss potenzieller, im Pool der Responderzellen enthaltener APC berücksichtigt wird. Gerade bei der Verwendung von Milzzellen als Responderzellen kommt diesem Umstand Bedeutung zu. Die Milz ist ein lymphatisches Organ und enthält neben Lymphozyten auch andere weiße Blutzellen in relevanter Menge, unter denen sich auch Zellen befinden, welche zur professionellen Antigenpräsentation fähig sind. Von diesem Problem sind insbesondere die OTII-Zellen betroffen, die für eine Aktivierung auf die Interaktion ihres TCR mit MHC-II-Molekülen angewiesen sind, welche unter normalen Umständen nur von professionellen APC gebildet werden. Um einen unerwünschten Effekt potenzieller APC vorwegzunehmen, wurden für die Experimente mit den OTII-Zellen aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Ein relevanter verfälschender Einfluss von Milz-APC auf die erhobenen Daten ist daher unwahrscheinlich.

Ein weiterer limitierender Faktor in der Ausführung der Kokulturrexperimente war die Separation der OT-Zellen nach mehrtägiger Kokultivierung mit Schwann-Zellen. Während der Kokultur kam es zu ausgeprägten Interaktionen zwischen beiden Zellarten und damit auch zu einer etwas festeren Adhäsion der OT-Zellen an die Schwann-Zellen. Zudem führte die mindestens 5-tägige Kultivierung der adhären und dabei sehr raumfordernd wachsenden Schwann-Zellen in den räumlich beengten Verhältnissen der 48-Well-Kulturplatten unvermeidlich zur Ablösung eines gewissen Anteils der Zellen. Daher ließ sich eine simultane Entnahme von Schwann-Zellen bei der Isolierung der OT-Zellen nicht völlig verhindern. Die trotz vorsichtigen und sorgfältigen Aberntens der Kulturwells möglicherweise gleichzeitig entnommenen Schwann-Zellen wurden jedoch spätestens durch die Färbung der OT-Zellen mit  $\alpha$ -CD4- bzw.  $\alpha$ -CD8-Antikörpern und anschließendes Gating bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von der Analyse ausgeschlossen, so dass ein verfälschender Einfluss diesbezüglich unwahrscheinlich ist.

### 1.3 Potenzielle zytotoxische Interaktionen zwischen Schwann-Zellen und OT-Zellen

Bei einer Kokultivierung von  $CD8^+$  T-Zellen mit Schwann-Zellen muss an potenzielle zytotoxische Interaktionen zwischen beiden Zelltypen gedacht werden. Dabei ist nicht nur die Destruktion von Schwann-Zellen durch T-Zellen zu bedenken (Spierings et al. 2001), sondern auch eine mögliche Schwann-Zell-induzierte T-Zell-Lyse. Letzterer Effekt konnte bereits an benignen Schwannomzellen beobachtet werden, welche in nicht antigenspezifischen Lymphozyten Apoptose induzieren konnten (Bonetti et al. 2003). Diese Hinweise lassen die Annahme zu, dass Schwann-Zellen auch eine Rolle in der Terminierung von Immunreaktionen spielen können (Meyer zu Horste et al. 2008). Interessant ist auch die Beobachtung, dass humane Schwann-Zellen nach Präsentation mykobakterieller Antigene von  $CD4^+$  T-Zellen lysiert werden können (Spierings et al. 2001). Eine ähnliche zytotoxische Wirkung von  $CD4^+$  Zelllinien mit einem für das P2-Protein in Myelinscheiden spezifischen TCR auf Ratten-Schwann-Zellen konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Argall et al. 1992). Dies könnte darauf beruhen, dass auch einige aktivierte ( $CD4^+$ )  $T_H1$ -Zellen auf ihrer Oberfläche den Fas-Liganden exprimieren und somit zur Übermittlung von Apoptosesignalen an Zielzellen fähig sind, welche auf ihrer Oberfläche den Fas-Rezeptor tragen.

Um derartige Interaktionen zwischen Schwann-Zellen und Lymphozyten in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten zu berücksichtigen, wurde zunächst die Vitalität sämtlicher Responderzellen nach Entnahme aus der Kokultur vor weiterer Analyse durch eine Avitalfärbung mit PI überprüft. Bei unveränderter Vitalität proliferierender Zellen in der Untersuchungsserie konnte ein zytotoxischer Einfluss nicht beobachtet werden und ist somit unwahrscheinlich. Dies ist möglicherweise auf die antigenspezifische Interaktion zurückzuführen.

Eine T-Zell-induzierte Schädigung der Schwann-Zellen kann allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Letztere lösten sich, wie oben bereits dargestellt, nach längerer Kultivierung in den 48-Well-Kulturplatten zu einem gewissen Anteil ab, jedoch ist nicht mit Sicherheit zu sagen, ob auch eine T-Zell-vermittelte Destruktion der Schwann-Zellen mitverantwortlich für diese Beobachtung ist. Dennoch argumentieren die Ergebnisse der Kokulturrexperimente in gewisser Hinsicht dagegen. Das unterschiedliche Ausmaß spezifischer T-Zell-Proliferation unter den verschiedenen Kulturbedingungen, d. h. An- bzw. Abwesenheit von Antigen sowie Dauer und Intensität der Prästimulation, ist als Zeichen für die funktionelle Aktivität der Schwann-Zellen in diesem Kokultursystem zu deuten. Zudem konnte nach alleiniger OT-Zell-Kultivierung keine Proliferation beobachtet werden (Daten

nicht gezeigt). Ein ausgeprägter zytotoxischer Effekt der OT-Zellen auf die Schwann-Zellen ist unter diesen Gesichtspunkten daher eher nicht anzunehmen.

#### 1.4 Einsatz von IFN- $\gamma$

Ein diskussionswürdiger Punkt in der Durchführung der Experimente dieser Arbeit ist auch der Einsatz des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  zur Stimulation von Schwann-Zellen, welche ein temperatursensitives Onkogen unter der Kontrolle eines IFN- $\gamma$ -responsiven Promotors exprimieren. Eventuell störende Einflüsse der IFN- $\gamma$ -Wirkung auf die Schwann-Zellen durch vermehrte Onkogenexpression unmittelbar vor der Kokultivierung mit den OT-Zellen können daher nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Um unerwünschte Effekte diesbezüglich zu minimieren, wurden die konditionell immortalisierten Schwann-Zellen vor der Kokultivierung mit OT-Zellen mindestens zwei Wochen bei den für die Ausdifferenzierung nötigen 37°C gehalten. Jegliches durch die IFN- $\gamma$ -Wirkung dennoch exprimierte Onkogen sollte nach dieser ausreichend langen Kultivierung bei 37°C zumindest funktionell inaktiv sein. In den Ergebnissen der Experimente ist zwar eine gewisse Abhängigkeit der T-Zell-Proliferation von der IFN- $\gamma$ -Konzentration zu erkennen, jedoch konnten auch in Abwesenheit von IFN- $\gamma$  Effekte beobachtet werden. Ein deutlicher störender Einfluss durch IFN- $\gamma$ -induzierte Aktivierung des Onkogenpromotors ist damit unwahrscheinlich.

## 2 Schwann-Zellen als konditionelle APC

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Schwann-Zellen als stimulierender Interaktionspartner für sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen fungieren können. Neben den professionellen APC können sie somit als konditionelle APC eine Rolle spielen. Voraussetzung dafür ist – zumindest *in vivo* – im Normalfall die Fähigkeit zur Antigenprozessierung und intrazellulären MHC-Beladung sowie der anschließenden Präsentation der MHC-Antigen-Komplexe an der Zelloberfläche. Zudem müssen kostimulatorische Moleküle für eine vollständige T-Zell-Aktivierung auf der Oberfläche der Schwann-Zellen vorhanden sein. Sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten konnten in GBS-assoziierten entzündlichen Infiltraten nachgewiesen werden (Pollard et al. 1987; Cornblath et al. 1990; Schmidt et al. 1996) und scheinen damit in den Entzündungsprozess

dieser Erkrankung entscheidend involviert zu sein. Dabei scheint ihre Bedeutung jedoch nicht gleichwertig zu sein. In Anlehnung an frühere Untersuchungen legen die Resultate dieser Arbeit nahe, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen – und damit verbunden auch die MHC-I-Präsentation – eine besondere Rolle spielen.

## **2.1 Schwann-Zellen exprimieren funktionell relevante MHC-Moleküle und stimulieren antigenspezifische T-Zellen**

Die MHC-Expression durch Schwann-Zellen wurde in früheren Untersuchungen bereits vielfach durch Experimente mit Ratten-Schwann-Zellen beschrieben (Samuel et al. 1987; Anselin und Pollard 1990; Armati et al. 1990; Argall et al. 1991; Lilje und Armati 1997). Daneben existiert auch eine Vielzahl von Ergebnissen, welche belegen, dass die bei Ratten-Schwann-Zellen beobachtete MHC-Expression zudem einer Regulation durch verschiedene Faktoren wie etwa proinflammatorisch wirkende Zytokine unterliegt (Samuel et al. 1987; Kingston et al. 1989; Anselin und Pollard 1990; Tsai et al. 1991; Bergsteinsdottir et al. 1992; Lisak und Bealmear 1992; Gold et al. 1995; Tsuyuki et al. 1998). Auch im ZNS wurde eine regulierte MHC-Expression durch Astrozyten beobachtet, wobei an der Regulation eine direkte Interaktion der Astrozyten mit ZNS-Neuronen maßgeblich beteiligt zu sein scheint (Tontsch und Rott 1993; Tontsch und Rott 1993).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse sind bis dahin also mit bereits gewonnenen Erkenntnissen in Einklang zu bringen. Desweiteren wurde an Kokultorexperimenten demonstriert, dass Schwann-Zellen fähig sind, exogene antigene Komponenten von Mykobakterien (Kingston et al. 1989; Ford et al. 1993; Spierings et al. 2001) sowie Myelin (Wekerle et al. 1986; Argall et al. 1992) aufzunehmen und T-Zellen zu präsentieren. In der vorliegenden Arbeit wurden speziell primäre Zellen verwendet und die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenziert untersucht und somit vorangegangene Arbeiten erweitert. Zudem konnte in vorherigen Untersuchungen auch die Existenz kostimulatorischer Moleküle wie B7.1 (CD80), BB-1 (Murata und Dalakas 2000; Spierings et al. 2001; Pollard 2002) und CD56 (Van Rhijn et al. 2000) auf Schwann-Zellen nachgewiesen werden. Demnach sind die notwendigen Komponenten für eine erfolgreiche T-Zell-Stimulation als solche auf der Oberfläche der Schwann-Zellen vorhanden. Dass sie auch funktionell aktiv werden können, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich.

Die Analyse der T-Zell-Stimulation durch Schwann-Zellen ergab, dass eine Aktivierung CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Präsentation sowohl von endogen synthetisiertem Protein als auch von

exogen zugeführtem, MHC-I-restringiertem Peptid erfolgte, ohne dass eine Prästimulation der Schwann-Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin IFN- $\gamma$  notwendig war. Jedoch konnte das Ausmaß der Antigenpräsentation und damit der T-Zell-Proliferation durch IFN- $\gamma$ -Einwirkung nochmals gesteigert werden. Diese Beobachtung wird gestützt durch die Ergebnisse der MHC-I-Expressionsanalyse, welche eine basale Menge an MHC-I-Molekülen auf der Schwann-Zell-Oberfläche und deren erhöhte Dichte nach IFN- $\gamma$ -Stimulation zeigte. Anders verhält es sich mit der intrazellulären Prozessierung exogenen Proteins für die Präsentation auf MHC-I-Molekülen, welche erst durch zusätzliche Prästimulation der Schwann-Zellen mit IFN- $\gamma$  induziert wurde. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf die Induktion sogenannter Kreuzpräsentation an dieser Stelle zurückzuführen.

CD4<sup>+</sup> antigenspezifische T-Zellen wurden in hohem Maße durch Präsentation von MHC-II-restringiertem Peptid aktiviert, während die alleinige Zugabe von Ovalbumin als exogenem Protein auch unter Prästimulation mit IFN- $\gamma$  nicht zur Zellproliferation führte. Dieser Umstand erscheint auf den ersten Blick irreführend, da man eine Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit potenzieller APC sowie dem spezifischen Antigen erst recht erwarten würde. Die Ursache dieser fehlenden Zellproliferation kann nicht vollends geklärt werden, beruht aber möglicherweise auf einer fehlenden Aufnahme oder Prozessierung von Antigen in den Schwann-Zellen. In anderen Experimenten konnte demonstriert werden, dass humane und Ratten-Schwann-Zellen in der Lage sind, exogenes Antigen – aus *Mycobacterium leprae* oder auch anderer Herkunft – aufzunehmen und zu prozessieren (Spierings et al. 2001; Meyer zu Horste et al. 2009). Vor diesem Hintergrund betrachtet ist es eher unwahrscheinlich, dass die fehlende T-Zell-Aktivierung auf unzureichende Antigenaufnahme oder -prozessierung durch die murinen Schwann-Zellen zurückzuführen ist. Eher sind andere Prozesse anzunehmen, welche in dem angewandten Kultursystem möglicherweise nicht effektiv ablaufen, wie etwa eine unzureichende Beladung der MHC-II-Moleküle mit Antigen. Jedoch fehlt jeglicher Beweis für solche Spekulationen. Nichtsdestotrotz zeigt die durch Präsentation des MHC-II-restringierten Peptids induzierte T-Zell-Aktivierung, dass die MHC-II-Expression auf der Oberfläche der Schwann-Zellen tatsächlich funktionell relevant ist.

## **2.2 Kreuzpräsentation durch Schwann-Zellen ist an der Stimulation spezifischer T-Zellen beteiligt**

Da die Antigenprozessierung und -präsentation ein komplexer, mehrdimensionaler Prozess ist, sollen in dieser Arbeit nicht nur die Antigenpräsentation an sich, sondern auch daran

beteiligte Mechanismen genauer analysiert werden. Durch vergleichende Einsicht in die beiden Pfade der Antigenprozessierung sowie ihrer Überschneidungen können bereits gewonnene Erkenntnisse vor allem dahingehend erweitert werden, inwieweit einzelne dieser komplexen Abläufe im Krankheitsprozess entzündlicher Erkrankungen des PNS funktionell relevant sind bzw. werden können. Ein wesentlicher Punkt ist dabei die Untersuchung, in welchem Ausmaß sogenannte Kreuzpräsentation an der Stimulation antigenspezifischer T-Zellen beteiligt ist.

Kreuzpräsentation als ein Phänomen, welches im Rahmen der Antigenprozessierung und MHC-Beladung auftreten kann, wurde bereits mehrfach beschrieben (Weiss und Bogen 1991; Malnati et al. 1992; Pfeifer et al. 1993; Dani et al. 2004). Als ein funktionell bedeutender Vorgang wird vor allem die Kreuzpräsentation durch DC angesehen, welche wesentlich für die Induktion einer  $CD8^+$ -Zell-Antwort gegenüber intrazellulären Erregern ist, die nicht direkt APC infizieren (Sigal et al. 1999). DC nehmen durch Makropinozytose ursprünglich extrazelluläres Antigen aus apoptotischen infizierten, Tumor-, Transplantat- oder auch eigenen Gewebezellen auf, welches nachfolgend ins Zytosol transferiert und nach proteasomaler Prozessierung auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden kann (Norbury et al. 1997). Dabei führt eine CD40-Stimulation, z. B. durch den CD40-Liganden auf einer aktivierten  $CD4^+$  T-Zelle, offenbar zu einer Aktivierung dieser MHC-I-Kreuzpräsentation (Bennett et al. 1998; Delamarre et al. 2003). Über diesen Mechanismus können DC effektiv naive, zytotoxische  $CD8^+$  T-Zellen aktivieren und sind damit an der Entstehung von Tumor- und Erregerresistenz sowie zytotoxischen Abstoßungsreaktionen gegen Fremdgewebe beteiligt (Albert et al. 1998). Zudem können immature DC durch konstitutive Kreuzpräsentation in der Peripherie die (Kreuz-)Toleranz von  $CD8^+$  T-Zellen gegenüber körpereigenem Gewebe kontrollieren, indem sie potenziell autoreaktive T-Zellen in einen anergen Zustand versetzen (Luckashenak et al. 2008).

In den Experimenten dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass exogenes Antigen durch Schwann-Zellen nicht nur auf MHC-II-, sondern auch in messbarem Umfang auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden und somit folglich die Aktivierung  $CD8^+$  T-Zellen nach sich ziehen kann. Interessant ist auch, dass die Stimulation  $CD8^+$  T-Zellen mittels Prozessierung und Präsentation exogenen Antigens auf MHC-I-Molekülen durch Schwann-Zellen erst unter  $IFN-\gamma$ -Einfluss zu beobachten ist, während die normale MHC-I-Präsentation auch in Abwesenheit proinflammatorischer Stimuli in deutlichem Maß erfolgt. Kreuzpräsentation ist also nicht nur als solche nachweisbar, sondern scheint sich als eine mögliche pathologische Funktion der Schwann-Zellen in entzündlich veränderter Umgebung auszubilden.

Bezüglich der Kreuzpräsentation auf MHC-II-Molekülen ist festzuhalten, dass endogen synthetisiertes Protein den hier erhobenen Ergebnissen nach zu urteilen nicht in funktionell relevantem Maße in den MHC-II-gekoppelten Antigenprozessierungspfad eingeschleust wird. Allerdings muss kritisch hinterfragt werden, ob auch hier, wie bei der fehlenden T-Zell-Stimulation durch Präsentation von exogenem Antigen auf MHC-II-Molekülen, einer ausbleibenden Zellproliferation unklare Faktoren zugrundeliegen können. Diese Annahmen sind jedoch, wie oben beschrieben, rein spekulativ. Daher ist davon auszugehen, dass eine MHC-II-Kreuzpräsentation an der Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht wesentlich beteiligt ist.

### 2.3 Relevanz der MHC-II-Präsentation durch Schwann-Zellen

Betrachtet man die Schwann-Zellen als konditionelle APC, interessiert der funktionelle Vergleich mit professionellen APC. In dieser Arbeit wurde analog zu den Schwann-Zellen die Antigenpräsentation durch BMDC untersucht.

Hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Expression insbesondere von MHC-II-Molekülen und dem Nachweis der oben beschriebenen induzierbaren MHC-I-Kreuzpräsentation weisen beide Zelltypen zunächst gewisse Gemeinsamkeiten auf. Dennoch lassen sich anhand der vorliegenden Ergebnisse vor allem bezüglich der MHC-II-Präsentation funktionelle Unterschiede zwischen den Schwann-Zellen als konditionellen und den BMDC als professionellen APC feststellen.

Diese Unterschiede manifestieren sich unter anderem in der Geschwindigkeit der Antigenprozessierung und -präsentation sowie dem Ausmaß der resultierenden T-Zell-Stimulation. Aus den Ergebnissen der Experimente lässt sich entnehmen, dass die MHC-II-gekoppelte Antigenpräsentation durch Schwann-Zellen gegenüber derer durch BMDC in etwa 24 Stunden länger benötigt, um eine – wenn überhaupt – vergleichbare T-Zell-Proliferation auszulösen. Existierende Untersuchungsergebnisse werden zudem um die Erkenntnis ergänzt, dass die bei den Schwann-Zellen beobachtete MHC-I-Präsentation der Präsentation auf MHC-II-Molekülen ebenfalls um etwa 24 Stunden vorausgeht. Insbesondere bei Betrachtung einer speziellen Funktion der professionellen APC, welche in der Aktivierung spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Präsentation exogenen Antigens auf MHC-II-Molekülen besteht, werden die Unterschiede zwischen beiden Zellarten deutlich. Im Falle der BMDC kann unter diesen Bedingungen eine nahezu maximale T-Zell-Proliferation beobachtet werden, wie es anhand ihrer Funktion als professionelle APC zu erwarten ist. Dagegen war eine relevante

Stimulation von antigenspezifischen T-Zellen durch Schwann-Zellen in Anwesenheit eines exogenen Proteinantigens auch unter der Wirkung von IFN- $\gamma$  in den Experimenten dieser Arbeit nicht zu sehen. Die Fähigkeit zur Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen als eine möglicherweise konditionelle Eigenschaft der Schwann-Zellen ist, den Erwartungen entsprechend, demnach – wenn überhaupt – bei weitem nicht so ausgereift wie die professionelle Antigenpräsentation durch DC.

Bezüglich der MHC-II-Präsentation auf Schwann-Zellen lässt sich zusammenfassend festhalten, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen – zumindest in diesem Kokultursystem – nur durch MHC-II-Moleküle in Kombination mit dem MHC-II-restringierten Oligopeptid Ova<sub>323-339</sub> stimulierbar sind. Dabei verwundert es zunächst, dass selbst unstimulierte Schwann-Zellen, auf deren Oberfläche den Ergebnissen der MHC-II-Expressionsanalyse zufolge MHC-II-Moleküle nicht in relevanter Menge vorhanden sind, nach Zugabe von Ova<sub>323-339</sub> eine derart ausgeprägte OTII-Zell-Proliferation induzieren konnten (ca. 80%). Zum einen ist es möglich, dass das Oligopeptid selbst einen gewissen stimulierenden Einfluss auf die MHC-II-Expression der Schwann-Zellen besitzt – ähnlich dem LPS, welches als Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien die MHC-II-Synthese in DC wesentlich steigern kann. Zum anderen unterstreicht die oben geschilderte Beobachtung die Funktionalität selbst dieser wenigen MHC-II-Moleküle auf unstimulierten Schwann-Zellen. Da für die Bindung des Oligopeptids an MHC-II-Moleküle eine Prozessierung desselben nicht erforderlich ist, lässt sich hierdurch jedoch lediglich die Funktionsfähigkeit der MHC-II-Moleküle nachweisen, während eine Beladung von MHC-II-Molekülen mit zuvor prozessiertem exogenen bzw. endogenen Proteinantigen und anschließende Präsentation nicht eindeutig zu beobachten ist. Möglicherweise limitiert somit die MHC-II-Beladung und nicht die MHC-II-Expression die Fähigkeit nicht professioneller APC wie Schwann-Zellen zur Antigenpräsentation.

Schwann-Zellen weisen also – insbesondere unter dem Einfluss proinflammatorischer Stimuli – gewisse Merkmale auf, welche auch professionelle APC auszeichnen. Jedoch kann – trotz funktionellen MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche – eine Stimulation CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels Präsentation von unverdaulichem exogenem Proteinantigen durch Schwann-Zellen nicht verzeichnet werden.

Unter Berücksichtigung der hier vorliegenden Ergebnisse lässt sich demnach schlussfolgern, dass die MHC-II-Präsentation auf Schwann-Zellen an sich potenziell funktionsfähig ist. Ihre klinische Relevanz für den Krankheitsprozess entzündlicher Erkrankungen des PNS ist damit aber nicht eindeutig geklärt. An der Aktivierung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Rahmen inflammatorischer Neuropathien sind mit Sicherheit professionelle APC beteiligt.



Vor dem Hintergrund dieser Arbeit lässt sich eine Involvierung von MHC-II-Präsentation auf Schwann-Zellen diesbezüglich jedoch keinesfalls ausschließen.

#### **2.4 Lokale MHC-I-Präsentation und zelluläre Immunabwehr als entscheidender Faktor bei der Induktion des Nervenschadens beim GBS**

Der Umstand, dass in Anwesenheit potenzieller APC und dem spezifischen Proteinantigen eine relevante Stimulation antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausbleibt, lässt keine eindeutige Schlussfolgerung zur funktionellen Relevanz der MHC-II-Präsentation von exogenem sowie endogenem Antigen durch Schwann-Zellen im entzündlichen Geschehen peripherer Nerven zu. Dagegen führt die MHC-I-gekoppelte Antigenpräsentation zu einer ausgeprägten Reaktion CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bereits durch verschiedene Untersuchungen immer wieder die Wichtigkeit von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Tiermodellen von hereditären Neuropathien (Ip et al. 2006) und Entzündungen des ZNS (Friese et al. 2008) betont wurde. Die Initiation einer zytotoxischen zellulären Immunantwort scheint somit für den Krankheitsprozess im Rahmen von inflammatorischen Neuropathien durchaus bedeutsam zu sein. Da auch Kreuzpräsentation auf MHC-I-Molekülen in relevantem Ausmaß an der Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen beteiligt ist, verbreitert sich das mögliche Angebot an potenziellem Antigen, welches zur Induktion einer zytotoxischen Reaktion führen kann. Trotz dieser Erkenntnisse ist allerdings davon auszugehen, dass neben der Stimulation antigenspezifischer T-Zellen durch Schwann-Zellen auch andere Faktoren an der Entstehung des Nervenschadens bei inflammatorischen Neuropathien maßgeblich beteiligt sind. Die Interaktion zwischen T-Zellen und antigenspezifischen professionellen APC, wie etwa gewebständigen oder einwandernden Makrophagen, spielt dabei ebenso eine Rolle (Kiefer et al. 2001). Zudem sind mittlerweile eine Reihe spezifischer Antikörper bekannt, welche durch die gestörte BNS-Schrankenfunktion beim GBS in das periphere Nervengewebe gelangen und die Destruktion beteiligter Strukturen induzieren können (Gregson et al. 1997; Ang et al. 2000; Ang et al. 2001).

In zurückliegenden Experimenten wurde nach systemischer Applikation ovalbuminspezifischer T-Zellen in peripheren Nerven von Ratten eine Entzündung induziert, welche nur lokal an Stellen auftrat, an denen zuvor Ovalbumin intraneural injiziert worden war (Harvey et al. 1995). Diese Ergebnisse lieferten entscheidende Hinweise, dass eine begleitende Schädigung nervaler Strukturen im Rahmen einer Entzündung nicht unbedingt eine spezifische nerven-assoziierte T-Zell-Antwort erfordert, sondern die T-Zell-Aktivierung

durch Antigenerkennung im Allgemeinen den wesentlichen Faktor in dieser Entwicklung darstellt. Demnach können also auch nicht nervenspezifische T-Zellen potenziell an der Entstehung einer Nervenentzündung beteiligt sein.

Dennoch legen die Ergebnisse dieser Arbeit einen wichtigen Einfluss auch von lokaler Antigenpräsentation und zellulärer Immunantwort bei inflammatorischen Neuropathien nahe. Zudem untermauert diese Arbeit die Hypothese, dass Schwann-Zellen nicht nur eine passive Rolle besitzen, sondern am entzündlichen Geschehen peripherer Nerven aktiv teilnehmen können. Die Antigenpräsentation kann neben ihrer Hauptfunktion als Myelinbildner als ein wichtiges pathologisches Merkmal der Schwann-Zellen angesehen werden und den Prozess der Nervenschädigung in inflammatorischen Neuropathien schüren.

## **2.5 Die Bedeutung lokaler Antigenpräsentation im Rahmen nicht-inflammatorischer Neuropathien**

Neben den entzündlichen Erkrankungen des PNS existieren auch weitere, nicht primär inflammatorische Neuropathien, welche erblich bedingt sein können. Interessant ist nun die Frage, ob und inwieweit lokale Antigenpräsentation auch in solchen nicht primär autoimmun bedingten Neuropathien eine Rolle spielt. Hereditären Neuropathien liegt meist ein genetisch fixierter Defekt bestimmter Proteine oder Zellbestandteile zugrunde. Sind Schwann-Zellen durch Mutationen in Myelin codierenden Genen betroffen, kann daraus eine pathologische Demyelinisierung resultieren. In einer Reihe von Experimenten konnte eine vermehrte endoneurale Ansammlung von T-Zellen und Makrophagen in Mäusen mit genetisch veränderten Myelinproteinen beobachtet werden (Schmid et al. 2000; Berghoff et al. 2005; Kobsar et al. 2005). Diese Zellen führten in diesem Fall zudem zu einem Fortschreiten der Demyelinisierung, während sowohl die Akkumulation von Immunzellen im PNS als auch eine pathologische Demyelinisierung in Mäusen mit zusätzlicher Immunschwäche in geringerem Maße auftraten (Kobsar et al. 2003; Berghoff et al. 2005). Die genetisch bedingte Instabilität pathologischer Myelinscheiden kann eine vermehrte Degradation und in der Folge auch Präsentation veränderter Myelinbestandteile durch beteiligte Schwann-Zellen nach sich ziehen. Die folglich vermehrte Präsentation unphysiologischer antigener Epitope auf MHC-I-Molekülen kann ihrerseits zur Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen führen und stellt damit einen möglichen Mechanismus dar, welcher als Bindeglied zwischen hereditären und inflammatorischen Neuropathien angesehen werden kann. Das gleichzeitige Auftreten von Merkmalen sowohl der erblichen als auch der inflammatorischen Neuropathie in demselben

Patienten wurde beschrieben (Nakai et al. 2001; Ginsberg et al. 2004). Es ist also wahrscheinlich, dass in manchen Fällen die pathologischen Prozesse beider Formen der Neuropathie gemeinsam an der Entstehung der Erkrankung beteiligt sind. Demnach haben beide Erkrankungsformen zwar unterschiedliche pathogenetische Hintergründe, dennoch lassen sich die Pathomechanismen nicht völlig voneinander trennen, da sich gerade die zugrundeliegenden immunologischen Prozesse bis zu einem gewissen Grad überschneiden können. Eine gewisse Beteiligung lokaler Antigenpräsentation durch Schwann-Zellen ist also auch bei erblichen Neuropathien anzunehmen.

### 3 Fazit

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass Schwann-Zellen in der Lage sind, sowohl antigenspezifische  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$  T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein des entsprechenden Antigens, in diesem Fall Ovalbumin. Diese Ergebnisse liefern einen deutlichen Hinweis darauf, dass die bereits zuvor beobachtete Expression von MHC-Molekülen durch Schwann-Zellen tatsächlich funktionell relevant ist. Zudem unterstützen sie die Annahme, dass den Schwann-Zellen unter bestimmten Umständen eine Rolle als konditionelle APC zukommen kann und sie durch Aktivierung sowohl von zytotoxischen T-Zellen als auch von T-Helferzellen Immunreaktionen im entzündeten peripheren Nerven unterhalten können. Es bleibt allerdings festzuhalten, dass diesbezüglich vor allem die Präsentation von Antigen auf MHC-I-Molekülen und die Initiierung einer zellulären, zytotoxischen Immunantwort von Bedeutung sind. Daran ist MHC-I-Kreuzpräsentation offenbar in relevantem Ausmaß beteiligt.

Auch funktionsfähige MHC-II-Moleküle können – insbesondere unter Einwirkung proinflammatorischer Stimuli – auf der Schwann-Zell-Oberfläche nachgewiesen werden. So kann durch MHC-II-restringiertes Peptid eine starke Proliferation antigenspezifischer  $CD4^+$  T-Zellen induziert werden. Dagegen erreicht sowohl exogenes als auch endogenes Proteinantigen die Zelloberfläche im Kontext von MHC-II-Molekülen – falls überhaupt – nur in einem Ausmaß, welches keine relevante Stimulation  $CD4^+$  T-Zellen nach sich zieht. Es bleibt unklar, ob, und wenn ja, an welcher Stelle die intrazellulären Reaktionsabläufe unterbrochen bzw. blockiert sind und ebenso, ob diese Beobachtung Ursachen hat, die möglicherweise in der Ausführung der Kokultorexperimente zu suchen sind, jedoch an dieser Stelle nicht näher identifiziert werden können. Es lässt sich nur vermuten, dass die Aktivierung antigenspezifischer  $CD4^+$  T-Zellen durch Erkennung MHC-II-gebundenen Antigens auf Schwann-Zellen für den Krankheitsprozess inflammatorischer Neuropathien durchaus relevant sein kann. Eine klare Aussage diesbezüglich kann anhand der hier vorliegenden Ergebnisse nicht getroffen werden. Dass durch Präsentation MHC-II-restringierten Peptids eine überaus starke Aktivierung antigenspezifischer  $CD4^+$  T-Zellen auch durch unstimulierte, d. h. nur geringe Mengen von MHC-II-Molekülen exprimierende Schwann-Zellen induzierbar ist, lässt weitere Untersuchungen in dieser Richtung angebracht erscheinen. So wäre es interessant, näher zu analysieren, inwieweit Schwann-Zellen – ähnlich wie DC – durch Antigen allein zur Steigerung der MHC-Synthese stimuliert werden können. Derartige Experimente könnten die hier dargestellten Beobachtungen vor allem hinsichtlich

der tatsächlichen funktionellen Relevanz MHC-II-gebundener Antigenpräsentation durch Schwann-Zellen sinnvoll ergänzen. Dennoch wird durch die vorliegenden Ergebnisse deutlich, dass lokale Antigenpräsentation durch Schwann-Zellen für den Krankheitsprozess inflammatorischer Neuropathien wie dem GBS pathophysiologisch eine entscheidende Rolle spielt. Auf der Grundlage dieser neuen Erkenntnisse ergeben sich möglicherweise zukünftig neue Therapieoptionen.

## V Zusammenfassung

Schwann-Zellen als die umhüllenden und myelinisierenden Zellen peripherer Nervenfortsätze sind in den Entzündungsprozess bei inflammatorischen Neuropathien wie dem GBS oder der CIDP entscheidend involviert. Dabei stellen sie Zielstrukturen autoreaktiver immunologischer Vorgänge dar, welche über eine Destruktion der Schwann-Zellen und damit der Myelinscheiden zu neurologischen Defiziten führen können.

Die Funktion der Schwann-Zellen in diesem Szenario wird seit einiger Zeit intensiv analysiert. Dennoch ist ihre genaue Bedeutung für die Entstehung des Nervenschadens im Rahmen der oben genannten Erkrankungen nicht vollends geklärt. In vorherigen Untersuchungen wurde mehrfach, vor allem deskriptiv, die MHC-Expression durch Schwann-Zellen demonstriert, jedoch wurde die funktionelle Relevanz dieser Beobachtung nicht näher analysiert. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Schwann-Zellen am Entzündungsgeschehen peripherer Nerven aktiv teilnehmen können. Der Einfluss inflammatorischer Faktoren befähigt sie zur vermehrten Synthese von MHC-I- sowie MHC-II-Molekülen, ebenso werden die intrazelluläre Antigenprozessierung durch proteasomale und lysosomale Proteindegradation und die Beladung von MHC-Molekülen mit antigenen Epitopen gesteigert. Durch die resultierende Präsentation von MHC-Antigen-Komplexen an der Zelloberfläche sind Schwann-Zellen in der Lage, antigenspezifische sowohl  $CD8^+$  als auch  $CD4^+$  T-Zellen zu aktivieren. Damit können sie als konditionelle APC lokale Immunreaktionen im PNS induzieren und auch weiter unterhalten. Die zentrale Rolle in der Entstehung der Nervenschädigung scheint dabei die Initiierung einer zellulären zytotoxischen Immunantwort zu spielen, während eine Stimulation beteiligter  $CD4^+$  T-Zellen vermutlich weniger durch Schwann-Zellen als eher durch professionelle APC erfolgt. Dennoch deuten die Ergebnisse dieser Arbeit, in Ergänzung bereits gewonnener Erkenntnisse, daraufhin, dass eine Aktivierung antigenspezifischer  $CD4^+$  T-Zellen mittels Präsentation von Antigen auf MHC-II-Molekülen durch Schwann-Zellen potenziell möglich ist.

Die Fähigkeit von Schwann-Zellen zur Induktion zytotoxischer Immunantworten durch Präsentation endogenen sowie exogenen Antigens auf MHC-I-Molekülen stellt zudem einen Angelpunkt dar, an welchem die mögliche Relevanz lokaler Antigenpräsentation auch im Rahmen nicht primär inflammatorischer Neuropathien angesiedelt werden kann. Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte das genaue Verständnis der immunologischen Prozesse, welche sich im Rahmen entzündlicher Erkrankungen des PNS abspielen, weiter vertieft

werden, so dass eventuell in Zukunft weitere Ansätze zur Optimierung therapeutischer Interventionen bei inflammatorischen Neuropathien entwickelt werden können.

**VI Literaturverzeichnis**

- Ackerman, A. L. und P. Cresswell (2004). "Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens." *Nat Immunol* 5(7): 678-84.
- Albert, M. L., et al. (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* 392(6671): 86-9.
- Alter, M. (1990). "The epidemiology of Guillain-Barre syndrome." *Ann Neurol* 27 Suppl: S7-12.
- Ang, C. W., et al. (2001). "Guillain-Barre syndrome- and Miller Fisher syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides induce anti-GM1 and anti-GQ1b Antibodies in rabbits." *Infect Immun* 69(4): 2462-9.
- Ang, C. W., et al. (2000). "Cross-reactive antibodies against GM2 and CMV-infected fibroblasts in Guillain-Barre syndrome." *Neurology* 54(7): 1453-8.
- Anselin, A. D. und J. D. Pollard (1990). "Immunopathological factors in peripheral nerve allograft rejection: quantification of lymphocyte invasion and major histocompatibility complex expression." *J Neurol Sci* 96(1): 75-88.
- Argall, K. G., et al. (1991). "The effects of West Nile virus on major histocompatibility complex class I and II molecule expression by Lewis rat Schwann cells in vitro." *J Neuroimmunol* 35(1-3): 273-84.
- Argall, K. G., et al. (1992). "Interactions between CD4+ T-cells and rat Schwann cells in vitro. 2. Cytotoxic effects of P2-specific CD4+ T-cell lines on Lewis rat Schwann cells." *J Neuroimmunol* 40(1): 19-29.
- Argall, K. G., et al. (1992). "Interactions between CD4+ T-cells and rat Schwann cells in vitro. 1. Antigen presentation by Lewis rat Schwann cells to P2-specific CD4+ T-cell lines." *J Neuroimmunol* 40(1): 1-18.
- Armati, P. J., et al. (1990). "Rat and human Schwann cells in vitro can synthesize and express MHC molecules." *Muscle Nerve* 13(2): 106-16.
- Arstila, T. P., et al. (1999). "A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity." *Science* 286(5441): 958-61.
- Ashton-Rickardt, P. G., et al. (1993). "Peptide contributes to the specificity of positive selection of CD8+ T cells in the thymus." *Cell* 73(5): 1041-9.
- Aspinall, G. O., et al. (1994). "Lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barre syndrome patients mimic human gangliosides in structure." *Infect Immun* 62(5): 2122-5.
- Barry, M., et al. (2000). "Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid." *Mol Cell Biol* 20(11): 3781-94.



- Barshes, N., et al. (2005). "Anatomy and physiology of the leptomeninges and CSF space." *Cancer Treat Res* 125: 1-16.
- Belich, M. P. und J. Trowsdale (1995). "Proteasome and class I antigen processing and presentation." *Mol Biol Rep* 21(1): 53-6.
- Bennett, S. R., et al. (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." *Nature* 393(6684): 478-80.
- Berghoff, M., et al. (2005). "Neuroprotective effect of the immune system in a mouse model of severe dysmyelinating hereditary neuropathy: enhanced axonal degeneration following disruption of the RAG-1 gene." *Mol Cell Neurosci* 28(1): 118-27.
- Bergsteinsdottir, K., et al. (1992). "Rat Schwann cells can be induced to express major histocompatibility complex class II molecules in vivo." *J Neurocytol* 21(5): 382-90.
- Bergsteinsdottir, K., et al. (1991). "Rat Schwann cells produce interleukin-1." *J Neuroimmunol* 34(1): 15-23.
- Bigbee, J. W., et al. (1987). "Morphological and proliferative responses of cultured Schwann cells following rapid phagocytosis of a myelin-enriched fraction." *J Neurocytol* 16(4): 487-96.
- Bonetti, B., et al. (2003). "T-cell cytotoxicity of human Schwann cells: TNFalpha promotes fasL-mediated apoptosis and IFN gamma perforin-mediated lysis." *Glia* 43(2): 141-8.
- Bonetti, B., et al. (2000). "Tumor necrosis factor alpha and human Schwann cells: signalling and phenotype modulation without cell death." *J Neuropathol Exp Neurol* 59(1): 74-84.
- Bose, S., et al. (2001). "gamma-Interferon decreases the level of 26 S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation." *Biochem J* 353(Pt 2): 291-7.
- Bouvier, M. und D. C. Wiley (1994). "Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules." *Science* 265(5170): 398-402.
- Brown, C. Y., et al. (1996). "Differential regulation of the stability of cytokine mRNAs in lipopolysaccharide-activated blood monocytes in response to interleukin-10." *J Biol Chem* 271(33): 20108-12.
- Burgdorf, S., et al. (2008). "Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation." *Nat Immunol* 9(5): 558-66.
- Cerdan, C., et al. (1995). "CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2 receptor." *Res Immunol* 146(3): 164-8.
- Chao, D. L., et al. (2005). "The effects of thymic selection on the range of T cell cross-reactivity." *Eur J Immunol* 35(12): 3452-9.

- Cornblath, D. R., et al. (1990). "Quantitative analysis of endoneurial T-cells in human sural nerve biopsies." *J Neuroimmunol* 26(2): 113-8.
- Coyle, A. J. und J. C. Gutierrez-Ramos (2001). "The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function." *Nat Immunol* 2(3): 203-9.
- Creange, A., et al. (2006). "[Inflammatory demyelinating neuropathies: classification, evolution and prognosis]." *J Soc Biol* 200(4): 301-6.
- Cresswell, P., et al. (2005). "Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation." *Immunol Rev* 207: 145-57.
- Czaplinski, A. und A. J. Steck (2004). "Immune mediated neuropathies--an update on therapeutic strategies." *J Neurol* 251(2): 127-37.
- Daikhin, Y. und M. Yudkoff (2000). "Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia." *J Nutr* 130(4S Suppl): 1026S-31S.
- Dani, A., et al. (2004). "The pathway for MHCII-mediated presentation of endogenous proteins involves peptide transport to the endo-lysosomal compartment." *J Cell Sci* 117(Pt 18): 4219-30.
- Davis, M. M. und P. J. Bjorkman (1988). "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition." *Nature* 334(6181): 395-402.
- Delamarre, L., et al. (2003). "Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation." *J Exp Med* 198(1): 111-22.
- Deretic, V. (2006). "Autophagy as an immune defense mechanism." *Curr Opin Immunol* 18(4): 375-82.
- Di Pucchio, T., et al. (2008). "Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I." *Nat Immunol* 9(5): 551-7.
- Di Terlizzi, R. und S. Platt (2006). "The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: part I - function and composition." *Vet J* 172(3): 422-31.
- Du Plessis, D. G., et al. (1996). "An ultrastructural study of the development of the chicken perineurial sheath." *J Anat* 189 ( Pt 3): 631-41.
- Ernst, B. B., et al. (1996). "Bone marrow-derived cells fail to induce positive selection in thymus reaggregation cultures." *J Exp Med* 183(3): 1235-40.
- Feasby, T. E., et al. (1986). "An acute axonal form of Guillain-Barre polyneuropathy." *Brain* 109 ( Pt 6): 1115-26.

- Feurer, D. J. und R. O. Weller (1991). "Barrier functions of the leptomeninges: a study of normal meninges and meningiomas in tissue culture." *Neuropathol Appl Neurobiol* 17(5): 391-405.
- Fontenot, J. D., et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* 4(4): 330-6.
- Ford, A. L., et al. (1993). "Schwann cells are able to present exogenous mycobacterial hsp70 to antigen-specific T lymphocytes." *J Neuroimmunol* 43(1-2): 151-9.
- Fowlkes, B. J. und E. Schweighoffer (1995). "Positive selection of T cells." *Curr Opin Immunol* 7(2): 188-95.
- Friese, M. A., et al. (2008). "Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis." *Nat Med* 14(11): 1227-35.
- Fujioka, T., et al. (2000). "Flow cytometric analysis of infiltrating cells in the peripheral nerves in experimental allergic neuritis." *J Neuroimmunol* 108(1-2): 181-91.
- Gaczynska, M., et al. (1993). "Role of proteasomes in antigen presentation." *Enzyme Protein* 47(4-6): 354-69.
- Gadient, R. A. und U. Otten (1996). "Postnatal expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat sympathetic and sensory ganglia." *Brain Res* 724(1): 41-6.
- Gao, G. F., et al. (1997). "Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2." *Nature* 387(6633): 630-4.
- Garbay, B., et al. (2000). "Myelin synthesis in the peripheral nervous system." *Prog Neurobiol* 61(3): 267-304.
- George, J. und J. A. Twomey (1986). "Causes of polyneuropathy in the elderly." *Age Ageing* 15(4): 247-9.
- Ginsberg, L., et al. (2004). "Coexistent hereditary and inflammatory neuropathy." *Brain* 127(Pt 1): 193-202.
- Gold, R., et al. (1995). "Synergistic effect of IFN-gamma and TNF-alpha on expression of immune molecules and antigen presentation by Schwann cells." *Cell Immunol* 165(1): 65-70.
- Goldrath, A. W. und M. J. Bevan (1999). "Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire." *Nature* 402(6759): 255-62.
- Gonzalo, J. A., et al. (2001). "Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation." *J Immunol* 166(1): 1-5.
- Greenfield, E. A., et al. (1998). "CD28/B7 costimulation: a review." *Crit Rev Immunol* 18(5): 389-418.

- Greenland, P. und R. C. Griggs (1980). "Arrhythmic complications in the Guillain-Barre syndrome." *Arch Intern Med* 140(8): 1053-5.
- Gregson, N. A., et al. (1997). "Reactivity of serum IgG anti-GM1 ganglioside antibodies with the lipopolysaccharide fractions of *Campylobacter jejuni* isolates from patients with Guillain-Barre syndrome (GBS)." *J Neuroimmunol* 73(1-2): 28-36.
- Grewal, I. S. und R. A. Flavell (1996). "The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation." *Immunol Rev* 153: 85-106.
- Griffin, J. W., et al. (1993). "Macrophage systems in peripheral nerves. A review." *J Neuropathol Exp Neurol* 52(6): 553-60.
- Griffin, J. W., et al. (1995). "Guillain-Barre syndrome in northern China. The spectrum of neuropathological changes in clinically defined cases." *Brain* 118 ( Pt 3): 577-95.
- Griffin, J. W. und K. Sheikh (2005). *The Guillain-Barré Syndromes. Peripheral Neuropathy.* P. J. Dyck and P. K. Thomas. Philadelphia, Elsevier Saunders. 2: 2197-2220.
- Griffin, T. A., et al. (1998). "Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits." *J Exp Med* 187(1): 97-104.
- Grisold, W., et al. (1991). "[Clinical symptoms and diagnostic criteria in polyradiculitis--Landry Guillain Barre]." *Wien Klin Wochenschr Suppl* 190: 3-7.
- Guermonprez, P. und S. Amigorena (2005). "Pathways for antigen cross presentation." *Springer Semin Immunopathol* 26(3): 257-71.
- Guerry, P., et al. (2002). "Phase variation of *Campylobacter jejuni* 81-176 lipooligosaccharide affects ganglioside mimicry and invasiveness in vitro." *Infect Immun* 70(2): 787-93.
- Guo, Y., et al. (1997). "Guillain-Barre syndrome: clinical analysis and pathological study on sural nerve biopsy of forty cases." *Chin Med J (Engl)* 110(9): 690-3.
- Harding, C. V. (1995). "Intracellular organelles involved in antigen processing and the binding of peptides to class II MHC molecules." *Semin Immunol* 7(6): 355-60.
- Harding, C. V. (1996). "Class II antigen processing: analysis of compartments and functions." *Crit Rev Immunol* 16(1): 13-29.
- Harvey, G. K., et al. (1995). "Non-neural-specific T lymphocytes can orchestrate inflammatory peripheral neuropathy." *Brain* 118 ( Pt 5): 1263-72.
- Heemels, M. T. und H. Ploegh (1995). "Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides." *Annu Rev Biochem* 64: 463-91.
- Hemmi, H., et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* 408(6813): 740-5.
- Hiltbold, E. M. und P. A. Roche (2002). "Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway." *Curr Opin Immunol* 14(1): 30-5.

- Ho, T. W., et al. (1999). "Anti-GD1a antibody is associated with axonal but not demyelinating forms of Guillain-Barre syndrome." *Ann Neurol* 45(2): 168-73.
- Howard, J. C. (1995). "Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules." *Curr Opin Immunol* 7(1): 69-76.
- Hughes, R. A. und D. R. Cornblath (2005). "Guillain-Barre syndrome." *Lancet* 366(9497): 1653-66.
- Hughes, R. A. und J. H. Rees (1997). "Clinical and epidemiologic features of Guillain-Barre syndrome." *J Infect Dis* 176 Suppl 2: S92-8.
- Hughes, R. A. C., et al. (1992). "Sural nerve biopsies in Guillain-Barré syndrome: axonal degeneration and macrophage associated demyelination and absence of cytomegalovirus genome." *Muscle Nerve* 15: 568-575.
- Imai, J., et al. (2005). "Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells." *Int Immunol* 17(1): 45-53.
- Ip, C. W., et al. (2006). "Immune cells contribute to myelin degeneration and axonopathic changes in mice overexpressing proteolipid protein in oligodendrocytes." *J Neurosci* 26(31): 8206-16.
- Jacobs, B. C., et al. (1998). "The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barre syndrome: a case-control study." *Neurology* 51(4): 1110-5.
- Jain, J., et al. (1995). "Transcriptional regulation of the IL-2 gene." *Curr Opin Immunol* 7(3): 333-42.
- Jat, P. S., et al. (1991). "Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(12): 5096-100.
- Jin, Y. Q., et al. (2008). "Efficient Schwann cell purification by differential cell detachment using multiplex collagenase treatment." *J Neurosci Methods* 170(1): 140-8.
- Ju, S. T., et al. (1999). "Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction." *Int Rev Immunol* 18(5-6): 485-513.
- Kagi, D., et al. (1994). "Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity." *Science* 265(5171): 528-30.
- Kaisho, T. und S. Akira (2000). "Critical roles of Toll-like receptors in host defense." *Crit Rev Immunol* 20(5): 393-405.
- Kanda, T. (2007). "[Polyneuropathy: diagnosis and treatment]." *Rinsho Shinkeigaku* 47(11): 769-73.
- Kanda, T. (2009). "[Peripheral neuropathy and blood-nerve barrier]." *Rinsho Shinkeigaku* 49(11): 959-62.

- Kanda, T., et al. (2004). "Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(5): 765-9.
- Kanda, T., et al. (2003). "Sera from Guillain-Barre patients enhance leakage in blood-nerve barrier model." *Neurology* 60(2): 301-6.
- Kariko, K., et al. (2004). "mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3." *J Biol Chem* 279(13): 12542-50.
- Kiefer, R., et al. (1998). "Macrophage differentiation antigens in acute and chronic autoimmune polyneuropathies." *Brain* 121: 469-79.
- Kiefer, R., et al. (2001). "The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system." *Prog Neurobiol* 64(2): 109-27.
- Kiernan, J. A. (1996). "Vascular permeability in the peripheral autonomic and somatic nervous systems: controversial aspects and comparisons with the blood-brain barrier." *Microsc Res Tech* 35(2): 122-36.
- Kingston, A. E., et al. (1989). "Schwann cells co-cultured with stimulated T cells and antigen express major histocompatibility complex (MHC) class II determinants without interferon-gamma pretreatment: synergistic effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor on MHC class II induction." *Eur J Immunol* 19(1): 177-83.
- Kobsar, I., et al. (2003). "Preserved myelin integrity and reduced axonopathy in connexin32-deficient mice lacking the recombination activating gene-1." *Brain* 126(Pt 4): 804-13.
- Kobsar, I., et al. (2005). "Evidence for macrophage-mediated myelin disruption in an animal model for Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A." *J Neurosci Res* 81(6): 857-64.
- Kusunoki, S., et al. (1994). "N-acetylgalactosaminyl GD1a is a target molecule for serum antibody in Guillain-Barre syndrome." *Ann Neurol* 35(5): 570-6.
- Kuwabara, S., et al. (2000). "Isolated absence of F waves and proximal axonal dysfunction in Guillain-Barre syndrome with antiganglioside antibodies." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68(2): 191-5.
- LeBlanc, A. C. und J. F. Poduslo (1990). "Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve." *J Neurosci Res* 26(3): 317-26.
- Lee, H., et al. (2006). "Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: implication in Wallerian degeneration." *Biochem Biophys Res Commun* 350(3): 742-7.
- Li, P., et al. (2005). "Compartmentalization of class II antigen presentation: contribution of cytoplasmic and endosomal processing." *Immunol Rev* 207: 206-17.
- Lich, J. D., et al. (2000). "Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins." *J Exp Med* 191(9): 1513-24.

- Lilje, O. (2002). "The processing and presentation of endogenous and exogenous antigen by Schwann cells in vitro." *Cell Mol Life Sci* 59(12): 2191-8.
- Lilje, O. und P. J. Armati (1997). "The distribution and abundance of MHC and ICAM-1 on Schwann cells in vitro." *J Neuroimmunol* 77(1): 75-84.
- Lilje, O. und P. J. Armati (1999). "Restimulation of resting autoreactive T cells by Schwann cells in vitro." *Exp Mol Pathol* 67(3): 164-74.
- Lisak, R. P. und B. Bealmear (1992). "Differences in the capacity of gamma-interferons from different species to induce class I and II major histocompatibility complex antigens on neonatal rat Schwann cells in vitro." *Pathobiology* 60(6): 322-9.
- Lizee, G., et al. (2003). "Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain." *Nat Immunol* 4(11): 1065-73.
- Luckashenak, N., et al. (2008). "Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8+ T cell tolerance in vivo." *Immunity* 28(4): 521-32.
- Lugaresi, A., et al. (1997). "Acute motor axonal neuropathy with high titer IgG and IgA anti-GD1a antibodies following *Campylobacter* enteritis." *J Neurol Sci* 147(2): 193-200.
- Malnati, M. S., et al. (1992). "Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells." *Nature* 357(6380): 702-4.
- Mancardi, G. L., et al. (1988). "HLA-DR Schwann cell reactivity in peripheral neuropathies of different origins." *Neurology* 38(6): 848-51.
- Manickasingham, S. P., et al. (1998). "Qualitative and quantitative effects of CD28/B7-mediated costimulation on naive T cells in vitro." *J Immunol* 161(8): 3827-35.
- Matzinger, P. und S. Guerder (1989). "Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell?" *Nature* 338(6210): 74-6.
- Maurer, M. und R. Gold (2002). "Animal models of immune-mediated neuropathies." *Curr Opin Neurol* 15(5): 617-22.
- McKhann, G. M., et al. (1993). "Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute flaccid paralysis in China." *Ann Neurol* 33(4): 333-42.
- Meyer zu Horste, G., et al. (2009). "Expression of antigen processing and presenting molecules by Schwann cells in inflammatory neuropathies." *Glia* 58(1): 80-92.
- Meyer zu Horste, G., et al. (2008). "The immunocompetence of Schwann cells." *Muscle Nerve* 37(1): 3-13.
- Meyer zu Horste, G., et al. (2006). "Myelin disorders: Causes and perspectives of Charcot-Marie-Tooth neuropathy." *J Mol Neurosci* 28(1): 77-88.

- Minami, Y., et al. (1993). "The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes." *Annu Rev Immunol* 11: 245-68.
- Mitchell, G. W., et al. (1991). "Class II antigen expression in peripheral neuropathies." *J Neurol Sci* 102(2): 170-6.
- Moore, M. W., et al. (1988). "Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation." *Cell* 54(6): 777-85.
- Munz, C. (2009). "Enhancing immunity through autophagy." *Annu Rev Immunol* 27: 423-49.
- Murata, K. und M. C. Dalakas (2000). "Expression of the co-stimulatory molecule BB-1, the ligands CTLA-4 and CD28 and their mRNAs in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." *Brain* 123: 1660-6.
- Murwani, R., et al. (1996). "Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 mRNA expression in neonatal Lewis rat Schwann cells and a neonatal rat Schwann cell line following interferon gamma stimulation." *J Neuroimmunol* 71(1-2): 65-71.
- Nakai, Y., et al. (2001). "Inflammatory pathological changes in a 2-year-old boy with Charcot-Marie-Tooth disease." *Brain Dev* 23(4): 258-60.
- Niedermann, G., et al. (1999). "The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens." *Immunol Rev* 172: 29-48.
- Nikolic-Zugic, J. und M. J. Bevan (1990). "Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire." *Nature* 344(6261): 65-7.
- Norbury, C. C., et al. (1997). "Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells." *Eur J Immunol* 27(1): 280-8.
- Oda, Y. und I. Nakanishi (1984). "Ultrastructure of the mouse leptomeninx." *J Comp Neurol* 225(3): 448-57.
- Ohkura, N. und S. Sakaguchi "Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function." *Semin Immunopathol*.
- Oliveira, R. B., et al. (2003). "Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy." *Infect Immun* 71(3): 1427-33.
- Oliveira, R. B., et al. (2005). "Cytokines and Mycobacterium leprae induce apoptosis in human Schwann cells." *J Neuropathol Exp Neurol* 64(10): 882-90.
- Pamer, E. und P. Cresswell (1998). "Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing." *Annu Rev Immunol* 16: 323-58.
- Parish, I. A. und W. R. Heath (2008). "Too dangerous to ignore: self-tolerance and the control of ignorant autoreactive T cells." *Immunol Cell Biol* 86(2): 146-52.



- Petrie, H. T., et al. (1990). "Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition in vivo and in vitro." *J Exp Med* 172(6): 1583-8.
- Pfeifer, J. D., et al. (1993). "Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells." *Nature* 361(6410): 359-62.
- Pollard, J. D. (2002). "Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy." *Curr Opin Neurol* 15(3): 279-83.
- Pollard, J. D., et al. (1987). "Class II antigen expression and inflammatory cells in the Guillain-Barre syndrome." *Ann Neurol* 21(4): 337-41.
- Pollard, J. D., et al. (1995). "Activated T cells of nonneural specificity open the blood-nerve barrier to circulating antibody." *Ann Neurol* 37(4): 467-75.
- Rader, A. J. und T. P. Barry (2009). "Symmetry of sensory loss in developing diabetic sensory polyneuropathy." *Foot Ankle Spec* 2(1): 16-21.
- Rambukkana, A., et al. (2002). "Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells." *Science* 296(5569): 927-31.
- Rammensee, H. G. (1995). "Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules." *Curr Opin Immunol* 7(1): 85-96.
- Rees, J. H., et al. (1995). "Campylobacter jejuni infection and Guillain-Barre syndrome." *N Engl J Med* 333(21): 1374-9.
- Robbins, N. F., et al. (1996). "Trafficking of major histocompatibility complex class II molecules through intracellular compartments containing HLA-DM." *Hum Immunol* 45(1): 13-23.
- Rock, K. L., et al. (2004). "Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation." *Nat Immunol* 5(7): 670-7.
- Roman, G. (1998). "Tropical myeloneuropathies revisited." *Curr Opin Neurol* 11(5): 539-44.
- Rowen, L., et al. (1996). "The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus." *Science* 272(5269): 1755-62.
- Saavedra, J. T., et al. (2008). "Myelination competent conditionally immortalized mouse Schwann cells." *J Neurosci Methods* 174(1): 25-30.
- Samuel, N. M., et al. (1987). "Gamma interferon, but not *Mycobacterium leprae*, induces major histocompatibility class II antigens on cultured rat Schwann cells." *J Neurocytol* 16(2): 281-7.
- Samuel, N. M., et al. (1987). "Expression of major histocompatibility complex class I and class II antigens in human Schwann cell cultures and effects of infection with *Mycobacterium leprae*." *Clin Exp Immunol* 68(3): 500-9.

- Sano, Y., et al. (2007). "Endothelial cells constituting blood-nerve barrier have highly specialized characteristics as barrier-forming cells." *Cell Struct Funct* 32(2): 139-47.
- Schmid, C. D., et al. (2000). "Immune deficiency in mouse models for inherited peripheral neuropathies leads to improved myelin maintenance." *J Neurosci* 20(2): 729-35.
- Schmidt, B., et al. (1996). "Inflammatory infiltrates in sural nerve biopsies in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating neuropathy." *Muscle Nerve* 19(4): 474-87.
- Sharpe, A. H. und G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." *Nat Rev Immunol* 2(2): 116-26.
- Shimizu, F., et al. (2008). "Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells." *J Cell Physiol* 217(2): 388-99.
- Shortman, K., et al. (1990). "The generation and fate of thymocytes." *Semin Immunol* 2(1): 3-12.
- Sigal, L. J., et al. (1999). "Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen." *Nature* 398(6722): 77-80.
- Skundric, D. S., et al. (1997). "Induced upregulation of IL-1, IL-1RA and IL-1R type I gene expression by Schwann cells." *J Neuroimmunol* 74(1-2): 9-18.
- Smith, P. A., et al. (1997). "Peptide-independent recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL)." *J Exp Med* 185(6): 1023-33.
- Spierings, E., et al. (2001). "Mycobacterium leprae-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4+ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy." *J Immunol* 166(10): 5883-8.
- Stanfield, R. L. und I. A. Wilson (1995). "Protein-peptide interactions." *Curr Opin Struct Biol* 5(1): 103-13.
- Steinhoff, U. und S. H. Kaufmann (1988). "Specific lysis by CD8+ T cells of Schwann cells expressing Mycobacterium leprae antigens." *Eur J Immunol* 18(6): 969-72.
- Stoll, G., et al. (2002). "Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation." *J Peripher Nerv Syst* 7(1): 13-27.
- Stout, R. D. und K. Bottomly (1989). "Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages." *J Immunol* 142(3): 760-5.
- Struzynska, L. (2009). "A glutamatergic component of lead toxicity in adult brain: the role of astrocytic glutamate transporters." *Neurochem Int* 55(1-3): 151-6.

- Sunderland, S. (1990). "The anatomy and physiology of nerve injury." *Muscle Nerve* 13(9): 771-84.
- Surh, C. D. und J. Sprent (1994). "T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus." *Nature* 372(6501): 100-3.
- Takeda, K., et al. (2003). "Toll-like receptors." *Annu Rev Immunol* 21: 335-76.
- Takeuchi, O., et al. (2000). "Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection." *J Immunol* 165(10): 5392-6.
- Teitelbaum, J. S. und C. O. Borel (1994). "Respiratory dysfunction in Guillain-Barre syndrome." *Clin Chest Med* 15(4): 705-14.
- Teng, M. K., et al. (1998). "Identification of a common docking topology with substantial variation among different TCR-peptide-MHC complexes." *Curr Biol* 8(7): 409-12.
- Tofaris, G. K., et al. (2002). "Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF." *J Neurosci* 22(15): 6696-703.
- Tontsch, U. und O. Rott (1993). "Cortical neurons selectively inhibit MHC class II induction in astrocytes but not in microglial cells." *Int Immunol* 5(3): 249-54.
- Tontsch, U. und O. Rott (1993). "Intercellular regulation of major histocompatibility complex class I expression in neural cells." *Immunology* 80(3): 507-9.
- Tsai, C. P., et al. (1991). "Interferon-gamma inhibition suppresses experimental allergic neuritis: modulation of major histocompatibility complex expression of Schwann cells in vitro." *J Neuroimmunol* 31(2): 133-45.
- Tsuyuki, Y., et al. (1998). "IFN-gamma induces coordinate expression of MHC class I-mediated antigen presentation machinery molecules in adult mouse Schwann cells." *Neuroreport* 9(9): 2071-5.
- Turley, S. J., et al. (2000). "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells." *Science* 288(5465): 522-7.
- Vabulas, R. M., et al. (2001). "Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells." *J Biol Chem* 276(33): 31332-9.
- Van der Meché, F. G., et al. (2001). "Diagnostic and classification criteria for the Guillain-Barre syndrome." *Eur Neurol* 45(3): 133-9.
- Van Rhijn, I., et al. (2000). "Expression of accessory molecules for T-cell activation in peripheral nerve of patients with CIDP and vasculitic neuropathy." *Brain* 123: 2020-9.
- Verghese, J., et al. (2001). "Peripheral neuropathy in young-old and old-old patients." *Muscle Nerve* 24(11): 1476-81.

- Vernadakis, A. (1988). "Neuron-glia interrelations." *Int Rev Neurobiol* 30: 149-224.
- Visser, L. H., et al. (1996). "Cytomegalovirus infection and Guillain-Barre syndrome: the clinical, electrophysiologic, and prognostic features. Dutch Guillain-Barre Study Group." *Neurology* 47(3): 668-73.
- Visser, L. H., et al. (1995). "Guillain-Barre syndrome without sensory loss (acute motor neuropathy). A subgroup with specific clinical, electrodiagnostic and laboratory features. Dutch Guillain-Barre Study Group." *Brain* 118 ( Pt 4): 841-7.
- von Boehmer, H., et al. (1989). "The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the alpha beta receptor for antigen." *Immunol Rev* 109: 143-51.
- Wagner, R. und R. R. Myers (1996). "Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves." *Neuroscience* 73(3): 625-9.
- Wan, Y., et al. (2005). "Cross-presentation of phage particle antigen in MHC class II and endoplasmic reticulum marker-positive compartments." *Eur J Immunol* 35(7): 2041-50.
- Wanschitz, J., et al. (2003). "Distinct time pattern of complement activation and cytotoxic T cell response in Guillain-Barre syndrome." *Brain* 126(Pt 9): 2034-42.
- Watts, C. (1997). "Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules." *Annu Rev Immunol* 15: 821-50.
- Weij, Y., et al. (2009). "An improved method for isolating Schwann cells from postnatal rat sciatic nerves." *Cell Tissue Res* 337(3): 361-9.
- Weiss, S. und B. Bogen (1991). "MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen." *Cell* 64(4): 767-76.
- Wekerle, H., et al. (1986). "Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes." *Eur J Immunol* 16(12): 1551-7.
- Wiendl, H., et al. (2003). "Antigen processing and presentation in human muscle: cathepsin S is critical for MHC class II expression and upregulated in inflammatory myopathies." *J Neuroimmunol* 138(1-2): 132-43.
- Wohlleben, G., et al. (2000). "Regulation of Fas and FasL expression on rat Schwann cells." *Glia* 30(4): 373-81.
- Wright, E., et al. (2008). "Neurologic disorders are prevalent in HIV-positive outpatients in the Asia-Pacific region." *Neurology* 71(1): 50-6.
- Yagi, H., et al. (2004). "Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells." *Int Immunol* 16(11): 1643-56.

- Yokota, T., et al. (1996). "The F wave disappears due to impaired excitability of motor neurons or proximal axons in inflammatory demyelinating neuropathies." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60(6): 650-4.
- York, I. A., et al. (1999). "Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation." *Immunol Rev* 172: 49-66.
- Yu, A. C., et al. (1993). "Astrogliosis in culture: I. The model and the effect of antisense oligonucleotides on glial fibrillary acidic protein synthesis." *J Neurosci Res* 34(3): 295-303.
- Yuan, C. L., et al. (2002). "Guillain-Barre syndrome: a retrospective, hospital-based study." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 65(11): 540-7.
- Yuki, N. (2001). "Infectious origins of, and molecular mimicry in, Guillain-Barré and Fisher syndromes." *Lancet Infect Dis* 1: 29-37.
- Yuki, N., et al. (2004). "Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(31): 11404-9.
- Yuki, N., et al. (1993). "A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure." *J Exp Med* 178(5): 1771-5.
- Yuki, N., et al. (1990). "Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following *Campylobacter* enteritis." *Neurology* 40(12): 1900-2.
- Zhang, D., et al. (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." *Science* 303(5663): 1522-6.
- Zochodne, D. W. (1999). "Diabetic neuropathies: features and mechanisms." *Brain Pathol* 9(2): 369-91.

## VII Anhang

### 1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle(n)
BCR	B-Zell-Rezeptor
BMDC	Bone marrow-derived dendritic cell(s) (engl.)
BNS	Blut-Nerven-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CD40-L	CD40-Ligand
CFSE	5(6)-Carboxyfluoresceindiacetat-N-Succimidylester
CIDP	Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CMV	Zytomegalievirus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle(n)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EMG	Elektromyogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell scanning
FCS	Foetales Kälberserum
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICC	Immunzytochemie
IF	Immunfloreszenz
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LB	Luria-Bertani Medium
LMP	Low molecular mass protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MHC	Major histocompatibility complex
MMN	Multifokale motorische Neuropathie
mRNA	messenger RNA
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
ORF	Open reading frame
OVA	Ovalbumin-DNA
OVA <sub>endogen</sub>	endogen synthetisiertes vollständiges Ovalbumin-Protein

---

OVA <sub>exogen</sub>	exogenes vollständiges Ovalbumin-Protein
Ova <sub>257-264</sub>	Ovalbumin-Peptid der Aminosäuren 257-264
Ova <sub>323-339</sub>	Ovalbumin-Peptid der Aminosäuren 323-339
PBS	Phosphate buffered saline
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SC	Schwann-Zelle(n)
TAP	Transporter associated with antigen processing
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
Treg-Zellen	Regulatorische T-Zellen
U	Unit(s)
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 2 Danksagung

Während der Durchführung dieser Arbeit habe ich von vielen Seiten wertvolle Unterstützung und Hilfe erfahren.

Mein Dank gilt zunächst Prof. B. Kieseier für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie insbesondere Gerd, welcher es auch in den schwierigen Phasen immer wieder geschafft hat, meinen Ehrgeiz neu zu entfachen.

Danken möchte ich auch Tatjana, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich insbesondere dem „Voodoo“ der molekularbiologischen Methoden nähergebracht hat. Ebenso Anne, welche mir besonders bei den dendritischen Zellen unter die Arme gegriffen hat. Daneben danke auch den vielen anderen Labormitarbeitern für kleine oder größere Hilfe und Gefälligkeiten.

Ganz besonders dankbar bin ich meinen Eltern und meiner Familie, die mich stets aufs Neue motiviert hat.

Zuguterletzt danke ich meiner Frau Nidhi, die meine größte Stütze war und mich geduldig durch diese teilweise anstrengende Zeit begleitet hat.



### **3 Eidesstattliche Erklärung**

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

Düsseldorf, den 12.10.2011

Holger Heidenreich

## 4 Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Geburtsdatum: 19.08.1982  
Geburtsort: Wesel  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung

1989 – 1993 Grundschule Liebfrauen, Bocholt  
1993 – 2002 St.-Georg-Gymnasium, Bocholt  
Abschluss: Abitur am 18.06.2002  
Note 2,0

### Hochschulausbildung

2003 – 2009 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
14.09.2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Gesamtnote „sehr gut“ (1,5)  
01.12.2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Gesamtnote „sehr gut“ (1,5)