Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. K. Pfeffer

Funktionelle Reifung Dendritischer Zellen im Zentralnervensystem

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sabine Adams

2004

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referentin: PD Dr. Gaby Reichmann

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. Helga Idel

Die in der vorliegenden Dissertation zusammengefassten Ergebnisse wurden von Februar 2000 bis Dezember 2001 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf erarbeitet.

Tagungsbeiträge:

Fischer, H. G., Volkmann, S., & Reichmann, G. 2000. Differentiation and functional maturation of dendritic cells from brain microglia. Joint annual meeting of the German and Dutch Societies of Immunology 2000, Düsseldorf. Immunobiology, 203: 376.

Fischer, H. G., Volkmann, S., & Reichmann G. 2001. Brain dendritic cells and microglia/ macrophages in central nervous system inflammation. Sixth International Congress of the International Society of Neuroimmunology, Edinburgh, UK. Journal of Neuroimmunology, 118: 75.

Schwarzenberg, A. M., Volkmann, S. & Fischer, H. G. 2001. A *Toxoplasma gondii* factor that triggers functional maturation of dendritic cells from mouse brain. Annual meeting of the German Society of Immunology, Dresden. Immunobiology, 204: 139.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft über das Graduiertenkolleg 320 'Pathologische Prozesse des Nervensystems: Vom Gen zum Verhalten'.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Das Gehirn als immunprivilegiertes Organ 1

1.2 Die Immunantwort auf eine Infektion mit *Toxoplasma gondii* 2

1.3 Dendritische Zellen (DC) als Induktoren der Immunantwort 4

1.3.1 Ontogenese, Phänotyp und Morphologie 4

1.3.2 Funktionelle Reifung und T-Zellaktivierung 6

1.3.3 DC im Gehirn 8

1.4 Zielsetzung der Arbeit 9

2 Material und Methoden 10

2.1 Material 10

2.1.1 Laborgeräte 10

2.1.2 Plastik- und Einwegartikel 11

2.1.3 Chemikalien 11

2.1.4 Puffer und Stammlösungen 12

2.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze 12

2.1.6 Bakterienmedien und Zusätze 13

2.1.7 Zytokine 13

2.1.8 Enzyme 13

2.1.9 Antikörper (Ak) 14

2.1.10 Molekularbiologische 'kits' 14

2.1.11 Primer und Sonde 14

2.1.12 Tiere 15

2.1.13 Zelllinien 15

2.1.14 Bakterienstamm und Vektor 16

2.1.15 Software 16

2.2 Methoden 16

2.2.1 Zellpräparationen 16

2.2.1.1 Milzzellen (MZ) 16

2.2.1.2 neonatale Hirnzellen 17

2.2.1.3 adulte Hirnzellen 17

2.2.1.4 *Toxoplasma gondii*-Hirnzysten 18

2.2.2 Aufreinigung von Zellpopulationen 18
2.2.2.1 Isolierung CD11c-positiver Zellen mit paramagnetischen 'beads' ...18
2.2.2.2 T-Zell-Reinigung über Nylonwolle und FcR/anti-Ig-Säule 18
2.2.3 Zellzahlbestimmung 19
2.2.4 Zellkultur 19
2.2.4.1 Hirnzell-Primärkultur 19
2.2.4.2 Kultivierung von *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten 20
2.2.4.3 Kultur transfizierter X63Ag8-653 GM-CSF Plasmozytomzellen 20
2.2.5 ELISA zur Bestimmung von GM-CSF 21
2.2.6 Proliferationstests 21
2.2.6.1 Proliferation alloreaktiver T-Zellen 22
2.2.6.2 Intrazelluläres Toxoplasmenwachstum 22
2.2.6.3 Szintillationsmessung der Thymidin- bzw. Uracil-Inkorporation 23
2.2.7 Analyse der Gen-Expression 23
2.2.7.1 Präparation von RNA 23
2.2.7.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ..24
2.2.7.3 'real-time' Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 25
2.2.7.4 Plasmidpräparation 26
2.2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese 27
2.2.7.6 Southern Blot 28

2.3 Statistik 29

3 Ergebnisse 30

3.1 Gewinnung von GM-CSF aus transfizierten Plasmozytomzellen 30

3.2 Differenzierung von DC aus Mikroglia 30
3.2.1 GM-CSF stimuliert die Entwicklung unreifer DC aus Mikroglia 30
3.2.2 LPS oder CD40-Ligation induzieren eine funktionelle Ausreifung 31

3.3 Expression von CD83 in Hirnzellen 34
3.3.1 Etablierung einer RT-PCR für den Nachweis von CD83 34
3.3.2 Wirkung von GM-CSF auf die Expression von CD83 in Gliazellen 36
3.3.3 Induktion der CD83-Expression im Hirn bei Toxoplasmose 38

3.4 GM-CSF induziert in Mikrogliazellen eine antiparasitäre Aktivität 42

4 Diskussion 49

4.1 DC im Zentralnervensystem 49

4.2 Mikroglia als Prä-DC? 51
4.3 Reifung intrazerebraler DC bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS 54
4.4 Antimikrobielle Aktivität unreifer Hirn-DC 57

5 Zusammenfassung 59

6 Abkürzungsverzeichnis 60

7 Literaturverzeichnis 62

8 Abbildungsverzeichnis 73

9 Dank 74

10 Erklärung 75

1 Einleitung

1.1 Das Gehirn als immunprivilegiertes Organ

Das Zentralnervensystem (ZNS) gilt als immunprivilegiertes Organ (Barker & Billingham, 1977). Mit diesem Status korreliert die Abschottung durch die Blut-Hirn-Schranke und die scheinbar fehlende Anbindung an das lymphatische System, darüber hinaus das Fehlen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II-positiver Zellen im Hirnparenchym und immunsupprimierende Effekte der neuronalen Mikroumgebung. Die intrazerebrale T-Zellantwort wird durch den antiproliferativen Effekt von ZNS-Lipiden und den 'transforming growth factor' gehemmt (Irani, 1998; Wibanks & Streilein, 1992; Hailer et al., 1998). Das aktuelle Konzept der Hirn-Immunität basiert darauf, dass aus dem Blut eingewanderte, aktivierte T-Zellen nach Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) oder Signalen aus der Mikroumgebung in Apoptose gehen (Ford et al., 1996; Bauer et al., 1998).

Im normalen ZNS hält die intakte Blut-Hirn-Schranke z. B. Immunglobuline (Ig) und Zytokinmoleküle zurück (Lampson, 1987). Dass die Blut-Hirn-Schranke keinen uneingeschränkten Schutz vor dem Eindringen von Erregern bietet, zeigt sich an Infektionskrankheiten, die sich im ZNS manifestieren. Erreger wie *Toxoplasma gondii* überwinden die Blut-Hirn-Schranke und induzieren Entzündungsprozesse im ZNS-Parenchym. Die Auslösung T-Zell-vermittelter Prozesse ist der zentrale Vorgang antigenspezifischer Abwehrreaktionen und immunpathologischer Vorgänge im Gehirn (Hickey & Kimura, 1988). Im Zuge der Infektion können auch naive T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke passieren und das Gehirn infiltrieren (Krakowski & Owens, 2000).

Es ist unklar, welche Zellen die infiltrierenden naiven T-Lymphozyten aktivieren und damit eine Immunreaktion gegen ZNS-Antigene auslösen. Die bislang im ZNS identifizierten APC – Mikroglia (Frei et al., 1987), perivaskuläre Zellen (Hickey & Kimura, 1988; Graeber et al., 1992) und Astrozyten (Fierz et al., 1985) – können *per se* diese Funktion nicht ausüben und benötigen ihrerseits eine Voraktivierung durch proinflammatorische Zytokine (Aloisi et al., 2000b). Astrozyten und Mikrogliazellen gelten als immunologisch aktive Zellen im ZNS. Sie sind zur Phagozytose befähigt (Watabe et al., 1989) und können als APC fungieren (Fierz et al., 1985) und Zytokine sezernieren (Hertz et al., 1990). Immunvermittelte Läsionen

des Gehirns, wie sie im Mausmodell bei der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) auftreten, sind stets mit einer lokalen Mikrogliose assoziiert (Gehrmann et al., 1993). Mikrogliazellen erlangen dabei einen makrophagenartigen Phänotyp (Kreutzberg, 1996) und sind phagozytisch aktiv.

Dagegen sind DC professionelle APC (Banchereau & Steinman, 1998), welche bei infektiöser Enzephalitis im Hirnparenchym lokalisiert und anhand DC-spezifischer Marker und Funktionen identifiziert wurden (Suter et al., 2000; Fischer et al., 2000).

Trotz des Fehlens von Lymphgefäßen konnten kürzlich Verbindungen des ZNS mit dem lymphatischen System nachgewiesen werden. Eine Drainage von ins Gehirn injizierten Proteinen in zervikale Lymphknoten stellt eine solche Verbindung dar (Cserr & Knopf, 1992). Im Gehirn können keine konventionellen Lymphgefäße nachgewiesen werden. Die extrazelluläre Flüssigkeit kann jedoch vom Subarachnoidalraum aus über die Arachnoidalzotten in den venösen Hirnsinus und damit ins Blut oder zum anderen über Verlängerungen des Subarachnoidalraums entlang bestimmter Hirnnerven wie z. B. dem Nervus olfactorius, der durch die cribriforme Platte zur Nasenschleimhaut zieht, in das lymphatische System gelangen.

1.2 Die Immunantwort auf eine Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der den Menschen als Zwischenwirt befällt. Die Toxoplasmeninfektion liefert ein geeignetes Modell, um die Abwehrmechanismen des Gehirns zu untersuchen. Im immunkompetenten Organismus kontrolliert das Immunsystem eine Toxoplasmeninfektion effektiv. Ist das Immunsystem jedoch geschwächt, kann die Infektion lebensbedrohlich verlaufen. Eine Toxoplasmeninfektion ruft im gesunden Organismus eine komplexe Immunantwort hervor, bei der angeborene und adaptive Abwehrmechanismen interagieren. Die Kontrolle der Infektion erfolgt letztendlich durch antigenspezifische, zellvermittelte Immunreaktionen (Subauste & Remington, 1993). Die Immunabwehr beendet die Ausbreitung des Parasiten im Wirtsorganismus, wobei der Parasit nicht vollständig eliminiert wird, sondern intrazelluläre Zysten, besonders im Gehirn, bildet.

Bei der Erstinfektion mit *Toxoplasma gondii* bildet der Parasit beim Zwischenwirt im Epithel des Dünndarms das schnell replizierende Tachyzoitenstadium und verbreitet sich über Zellen des Blut- oder Lymphsystems und infiziert Wirtszellen in anderen Geweben, insbesondere im ZNS, in der Muskulatur und in der Lunge. Auf das

Eindringen von *Toxoplasma gondii* reagiert der Wirt zunächst mit Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität, deren Ziel es ist, die Ausbreitung des Erregers zu begrenzen. Hierbei sind primär DC, Makrophagen und infizierte Wirtszellen beteiligt. Durch Mechanismen der adaptiven Immunität wird der Parasit aus nahezu allen Geweben eliminiert. Die Infektion geht in die chronisch latente Phase über. Als Dauerform bildet *Toxoplasma gondii* im Zwischenwirt Gewebezysten, welche den Parasiten als Bradyzoiten enthalten. In Form enzystierter Bradyzoiten persistiert *Toxoplasma gondii* lebenslang in einem Zwischenwirt. Diese Zysten findet man besonders im Gehirn (Dubey & Beattie, 1988; Dubey & Frenkel, 1976). An der Immunität gegen *Toxoplasma gondii* sind T-Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) von Bedeutung (Sher et al., 1993; Denkers et al., 1993).

In der akuten Phase der Infektion sind Makrophagen und NK-Zellen entscheidend an der Immunreaktion gegen den Parasiten beteiligt. (Gazzinelli et al., 1993). Daneben wirken T-Zellen und DC bei der Immunantwort mit. Makrophagen sind die wichtigsten antiparasitären Effektorzellen. Außerdem sind Makrophagen und NK-Zellen Produzenten von proinflammatorischen Zytokinen. Makrophagen sezernieren Interleukin (IL)-1α und β, IL-12 und Tumornekrosefaktor (TNF)α. NK-Zellen produzieren den Makrophagen-aktivierungsfaktor Interferon (IFN)γ. T-Zellen sezernieren ebenso IFNγ, während DC als weitere wichtige Produzenten von IL-12 gelten (Sher & Reis e Sousa, 1998).

In ihrer Bedeutung als primäre Auslöser einer antigenspezifischen Immunantwort nehmen DC eine Sonderstellung ein. An der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität können sie im Rahmen der angeborenen Immunität IL-12 sezernieren und sind im Hinblick auf die adaptive Immunität befähigt, ruhende T-Zellen antigenspezifisch zu aktivieren (Steinman, 1991).

Die an der angeborenen Immunität beteiligten Zellen kooperieren über die von ihnen ausgeschütteten Zytokine. Das von Makrophagen und DC sezernierte IL-12 aktiviert NK-Zellen und induziert in diesen die Produktion von IFNγ. Das von den NK-Zellen sezernierte IFNγ induziert schließlich verschiedene zytotoxische und zytostatische Effektormechanismen und gilt als der Hauptmediator der Resistenz gegenüber *Toxoplasma gondii* (Suzuki et al., 1988). APC stimulieren $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, die ebenfalls IFNγ sezernieren, was in infizierten Wirtszellen antiparasitäre Wirkmechanismen induziert. Dadurch werden infizierte Wirtszellen und extrazelluläre Erreger abgetötet. Diese Reaktionskaskade leitet den Entzündungsprozeß ein.

Es konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen als wichtige Effektorzellen die Proliferation von *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten im Gehirn verhindern können. Sowohl in humanen (Chao et al., 1994) als auch in murinen (Chao et al., 1993) in vitro Experimenten konnten Mikrogliazellen durch IFNγ dazu aktiviert werden, die intrazelluläre Proliferation von Tachyzoiten zu verhindern.

1.3 Dendritische Zellen (DC) als Induktoren der Immunantwort

1.3.1 Ontogenese, Phänotyp und Morphologie

DC sind besondere APC, weil sie alleine eine primäre Immunantwort induzieren und damit ein immunologisches Gedächtnis etablieren können (Banchereau & Steinman, 1998; Steinman, 1991). Aus DC-Vorläuferzellen im Knochenmark entstehen im Blut zirkulierende Vorläuferzellen. Diese besiedeln als unreife Zellen das Interstitium in fast allen Organen. In diesem unreifen Stadium sind sie unfähig, naive T-Zellen zu stimulieren und haben eine hohe phagozytische Aktivität. Bei immunvermittelten Läsionen nehmen sie lokal Antigene auf und wandern zu lymphatischen Organen, wo sie auf T-Zellen treffen und das Antigen präsentieren und somit eine gegen das Antigen gerichtete Immunantwort initiieren. Eine weitere besondere Funktion von DC ist die Fähigkeit zur 'cross presentation'. Das bedeutet, dass DC als einzigartige Funktion die Möglichkeit besitzen exogene Antigene, welche normalerweise auf MHC II-Molekülen präsentiert werden, auf MHC I-Molekülen zu präsentieren.

In der Maus wurden zwei Subpopulationen von DC mit wahrscheinlich unterschiedlichem Ursprung identifiziert: sogenannte lymphoide und myeloide DC (Vremec & Shortman, 1997; Pulendran et al., 1997). Diese induzieren eine unterschiedliche Immunantwort (Pulendran et al., 1999; Rissoan et al., 1999). Die lymphoiden DC induzieren die Bildung von Th1 Zytokinen wie IFNγ und IL-2, jedoch kaum Th2 Zytokine. Im Gegensatz dazu induzieren myeloide DC die Bildung großer Mengen von Th2 Zytokinen, wie IL-4 und IL-10 zusätzlich zu IFNγ und IL-2 (Pulendran et al., 1999). Lymphoide DC entwickeln sich aus frühen lymphoiden Vorläufern unter dem Einfluss von IL-3, jedoch unabhängig von Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) (Saunders et al., 1996; Ardavin et al., 1993). Myeloide DC entwickeln sich in vitro aus Knochenmarkzellen oder Blutmonozyten abhängig von GM-CSF (Inaba et al., 1992; Schreurs et al., 1999). Beiden ist der phänotypische Marker CD11c gemeinsam (Metlay et al., 1990), jedoch unterscheiden sie sich bezüglich der Expression anderer Oberflächenmarker.

CD8α und CD1d werden selektiv auf lymphoiden DC und 33D1 auf myeloiden DC exprimiert, welche zudem die Makrophagenmarker F4/80 und CD11b exprimieren (Pulendran et al., 1999; Vremec & Shortman, 1997).

In den meisten Geweben kommen DC in einem unreifen Stadium vor und sind nicht fähig naive T-Zellen zu stimulieren. Sie sind jedoch für die Antigenaufnahme ausgestattet. Diese Antigene können dann die Ausreifung der DC induzieren.

DC zeichnen sich durch eine charakteristische Morphologie (Abb. 1) aus. Sie haben einen meist irregulär geformten Kern, viele Mitochondrien, wenige Phagosome und eine Vielzahl segelartiger zytoplasmatischer Ausläufer, aufgrund welcher sie auch als 'veiled cells' bezeichnet werden (Steinman & Cohn, 1973).

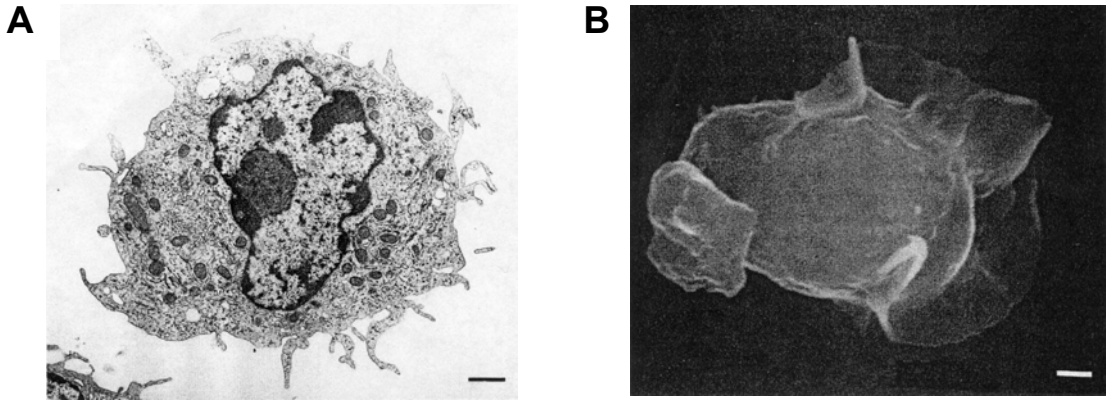


Abb. 1. Morphologie von DC

(A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer unreifen DC, hier aus einer Leberprimärkultur, die mit GM-CSF supplementiert war. Die Zellen weisen einen irregulär geformten Kern, prominente Nukleolen, wenige Granula und zahlreiche Mitochondrien auf.
(B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme solcher DC aus der gleichen Kultur, mit zytoplasmatischen segelartigen Ausläufern.
(aus Lu et al., J. Exp. Med., 1994, Balken 1 µm)

1.3.2 Funktionelle Reifung und T-Zellaktivierung

DC sind die Zellen, die antigenspezifische Immunantworten initiieren und prägen. Damit spielen sie eine Schlüsselrolle bei der Immunabwehr sowie bei der Erzeugung von Autoimmunität oder Toleranz (Banchereau & Steinman, 1998).

Unreife DC nehmen Antigen in der Peripherie auf und sind unfähig T-Zellen zu stimulieren. In Anwesenheit von Stimuli wie mikrobiellen Produkten oder inflammatorischen Zytokinen reifen diese DC. Hierbei regulieren sie Adhäsions- und kostimulatorische Moleküle hoch und erwerben die Fähigkeit, naive T-Zellen antigenspezifisch zu aktivieren.

DC lassen sich außer in den klassischen Geweben wie Lymphknoten und Haut auch im Interstitium der Leber, der Nieren und im Herz lokalisieren (Streptoe & Thomson, 1999). In den T-Zellregionen lymphatischer Organe sind sie ebenso präsent und werden hier als interdigitierende DC bezeichnet. DC aus nicht lymphatischen Geweben können mit dem Blut oder mit der Lymphe zu sekundären lymphatischen Organen gelangen und hier ihr in der Peripherie aufgenommenes Antigen gegenüber naiven T-Zellen präsentieren. Somit weisen sie zunächst meistens den Phänotyp einer unreifen, antigen-prozessierenden Zelle auf. Dieses unreife Stadium ist durch niedrige bis moderate Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen und hohe Endozytose-Aktivität charakterisiert. Obwohl ihnen die kostimulatorischen Moleküle zur T-Zell-Aktivierung wie CD40, CD54, CD58, CD80 und CD86 fehlen, sind sie zur Antigenaufnahme und -prozessierung fähig. Zugabe exogener Faktoren kann die Umwandlung zur reifen DC induzieren. Die meisten Aktivatoren der DC-Reifung lassen sich in zwei Gruppen einordnen: entweder mikrobielle Produkte oder T-Zell-Produkte. Ein traditioneller mikrobieller Stimulus ist Lipopolysaccharid (LPS). Auch Protozoen wie *Toxoplasma gondii* können die Reifung der DC induzieren. Zu den T-Zell-Produkten ist der CD40 Ligand (CD154) zu rechnen (Reis e Sousa et al., 1999). Die reife DC zeichnet sich durch hohe Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen aus. Dabei verliert die DC die Fähigkeit zur Antigenaufnahme und entwickelt T-Zell-stimulatorische Aktivität. Die reife DC ist zur Antigenpräsentation gegenüber naiven T-Zellen fähig. Die reife DC produziert große Mengen von MHC Klasse II-Molekülen auf ihrer Oberfläche. Ebenso werden die Moleküle CD40, CD54, CD58, CD80 und CD86 in großen Mengen exprimiert. Während dieses Reifungsprozesses wird die Expression von CD83, einem DC-Reifungsmarker ebenso stark hochreguliert. Humanes CD83 ist ein 45 kDA großes Glykoprotein und gehört zur Ig-Superfamilie (Zhou et al., 1992; Kozlow et al., 1993).

Kürzlich wurde die Klonierung und biochemische Charakterisierung von murinem CD83 beschrieben (Twist et al., 1998; Berchtold et al., 1999). Die selektive Expression und Hochregulation zusammen mit kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 lässt eine wichtige Rolle für CD83 bei der Immunantwort vermuten (Zhou & Tedder, 1996). In Abb. 2 sind Merkmale unreifer und reifer DC vergleichend dargestellt.

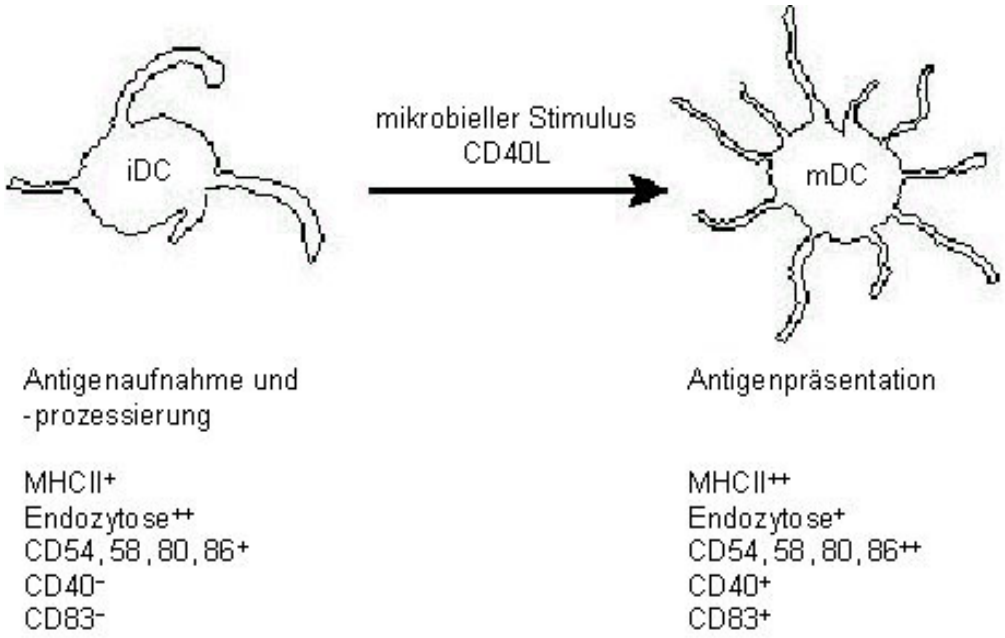


Abb. 2. Merkmale unreifer und reifer DC

Unreife DC (iDC) prozessieren Antigen und differenzieren in Gegenwart von GM-CSF, unter dem Einfluss mikrobieller Stimuli wie LPS oder durch Ligation des CD40 auf der DC, zur reifen DC (mDC) (nach Banchereau & Steinman, 1998).

Nachdem DC Antigen prozessiert und kostimulatorische Moleküle hochreguliert haben, wandern sie zu lymphatischen Organen wie Lymphknoten oder Milz und aktivieren antigenspezifisch T-Zellen. Hieraus werden zwei wesentliche und charakteristische Funktionen von DC ersichtlich: Erstens die Antigenprozessierung und zweitens die Stimulation von T-Zellen.

1.3.3 DC im Gehirn

Infolge entzündlicher Prozesse im ZNS erscheinen DC rasch am Ort der Inflammation. Dieser Zelltyp ist im normalen Gehirn nicht nachgewiesen. Anhand von Oberflächenmarkern wurden DC im Hirnparenchym der Maus erstmals bei EAE und der Toxoplasmenenzephalitis (TE) immunzytochemisch lokalisiert (Suter et al., 2000; Fischer et al., 2000; Serafini et al., 2000), isoliert und funktionell identifiziert (Fischer et al., 2000). In beiden Modellen T-zellabhängiger entzündlicher ZNS-Erkrankungen enthält die Population intrazerebraler DC ausschließlich Zellen, die phänotypisch dem myeloiden DC-Subtyp entsprechen und damit in Beziehung zu Zellen der Monozyten/Mikroglia/Makrophagen-Linie stehen. Von diesen unterscheiden sie sich jedoch morphologisch und ultrastrukturell (Fischer & Reichmann, 2001).

Aus dem entzündlichen Hirn isolierte DC exprimieren die für T-Lymphozyten kostimulatorischen Liganden CD40, CD80 und CD86. Funktionell sind sie durch die Fähigkeit charakterisiert, sowohl naive als auch 'antigen-primed' T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren. Auch im Zytokinprofil unterscheiden sich die DC aus dem ZNS von der lokalen Makrophagen/Mikroglia-Population: Hirn-DC sind die Hauptproduzenten von IL-12, wohin Makrophagen/Mikroglia vorwiegend die proinflammatorisch wirkenden Moleküle TNFα, IL-1α und NO aber auch IL-10 sezernieren (Fischer & Reichmann, 2001).

Während die Existenz von DC im entzündlich veränderten Gehirn als gesichert gilt, ist die Rolle, die sie bei zellulären Immunreaktionen vor Ort spielen, sowie ihre Herkunft ungeklärt. Drei prinzipiell unterschiedliche Wege scheinen denkbar: (i) Hirn-DC stammen von unreifen DC aus der Pia mater (Mc Menamin, 1999), die über den perivaskulären Spalt ins Hirnparenchym einwandern (Aloisi et al., 2000b). (ii) Sie entwickeln sich aus im Blut zirkulierenden Vorläufern, die gemäß dem aktuellen Konzept (Banchereau et al., 2000) zum Entzündungsherd rekrutiert werden. (iii) Sie entstehen lokal aus hirnständigen Vorläufern. Evidenz für die letztere Möglichkeit liefern zahlreiche zellbiologische Charakteristika, die Mikroglia und unreifen DC gemeinsam sind (Carson et al., 1998; Fischer & Bielinsky, 1999; Aloisi et al., 2000a; Santambrogio et al., 2001). Alle drei Wege implizieren eine funktionelle Ausreifung der DC im entzündlichen Hirngewebe.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Mit dem Projekt sollte die mögliche Differenzierung hirnresidenter Zellen zu DC untersucht werden. Vorexperimente an Maus-Chimären schließen einen solchen Differenzierungsweg nicht aus. Mikrogliazellen stellen eine Population mutmaßlicher DC-Vorläufer im ZNS dar. In dieser Arbeit sollte zum einen ein Nachweis für die postulierte Reifung von Hirn-DC in vivo und in vitro erbracht werden und zum anderen immunologische Stimuli im in vitro-Modell analysiert werden.

Es sollte die intrazerebrale Reifung von DC während der Hirninflammation anhand von CD83, einem Marker reifer DC (Kruse et al., 2000) nachgewiesen und zeitlich verfolgt werden. Außerdem sollten die CD83 exprimierenden Zellen identifiziert werden. Dazu sollte die Expression von CD83 mittels RT-PCR untersucht und in einer 'real-time' Polymerase-Kettenreaktion (PCR) quantifiziert werden.

Exogene Stimuli, welche für die Differenzierung von Mikroglia bis hin zur funktionell aktiven DC benötigt werden, sollten bestimmt werden. Mit der allostimulatorischen Aktivität als Mess-Strecke sollte die Wirkung von GM-CSF für die Entwicklung zu unreifen DC und der Effekt der CD40-Ligation für ihre Ausreifung untersucht werden. Bislang ist für Mikroglia allein die Präsentation gegenüber 'antigen-primed' T-Zellen nachgewiesen (Fischer & Bielinsky, 1999; Aloisi et al., 2000a).

Als T-Zell unabhängige Funktion sollte eine antimikrobielle Aktivität der Zellen untersucht werden. In Vorversuchen konnte zum einen gezeigt werden, dass Mikroglia unter dem Einfluss von GM-CSF eine von IFNγ-unabhängige Toxoplasmenhemmung bewirkt und zum anderen, dass diese Aktivität auch gegenüber anderen infizierten Zellen ausgeübt wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Agarosegelkammern	AGS
Bestrahlungsgerät	Gammacell 100 Elite, MDS Nordion
Brutschrank	B 5060 EK/CO_2, Heraeus
Dampfdrucksterilisator	Autoklav P23, Melag
Digitalwaage	Precisa 600 C, Oehmen Labortechnik
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Reader	Spectra, SLT
Gelaufnahmegerät	Classic Box und DuoStore, Intas
Heizblöcke	Thermomixer 5436, Eppendorf Techne Dri Block DB2A
Kühlzentrifugen	Rotanta 96 RC, Hettich J6B, Beckmann
Mikroskope	Axiovert 100, Zeiss Binokular Nikon SMZ Zeiss Standard 18
Mikrowelle	Micromat, AEG
Netzgerät	Phero-Stab 200, Biotec Fischer
Magnetrührer	IKAmag RCT, Jahnke & Kunkel
pH-Meter	761 Calimatic, Knick
Pipetten	Finnpipette, Labsystems
Quarzküvetten	100µl, Hellma
Röntgenfilmkammer	Rego
Schüttler	GFL 3013, GFL
Spektralphotometer	Gene Quant II, Pharmacia
Sterilbank	SLEE
Szintillationszähler	LKB Betaplate 1205, Pharmacia
Tischzentrifuge	universal 32R, Hettich
Thermocycler	PCR Express, Hybaid
Ultrazentrifuge	L-60 mit SW-41Ti Rotor, Beckmann
UV-Schirm	Fluolink, Biometra
Vortex	MS1 Minishaker, IKA
Wasserbäder	Typ 3041, Köttermann GFL 1083, GFL
Zellerntegerät	Basic 96 Harvester, Skatron

2.1.2 Plastik- und Einwegartikel

Sämtliche Plastikwaren wurden steril geliefert oder bei Bedarf im Autoklav sterilisiert (50 Minuten (min), 1bar).

Einmalspritzen, 20 ml	Omnifix, Braun
Reaktionsgefäße, 0.5 und 1.5 ml, unsteril	Greiner
Reaktionsgefäße für PCR, 0.5 ml, unsteril	Biozym
Filterpapier	Whatman
Kanülen, 18, 20 und 22 gauge	Becton Dickinson
Magnetic cell sorting (MACS)-Säulen	Milteny Biotec
Mehrfachkulturschalen 6 und 24 wells	Costar
Testplatten für ELISA	Nunc
Mikrotiterplatten, 96 und 96A/2 wells	Greiner, Costar
Testplatten für 'real-time' PCR	Applied Biosystems
Objektträger	Engelbrecht
Pasteurpipetten, steril	Copan, Bioster
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Polylab
Plastikpipetten, 10 und 25 ml	Costar
Röntgenfilm	Kodak
Sterilfilter, 0.2 μm	Sartorius
T-Zell-Säulen	R & D Systems
Zellkulturflaschen, 25 und 75 cm^2	Costar
Zellschaber	Greiner
Zentrifugenröhrchen, 15 und 50 ml	Greiner
Ultrazentrifugenröhrchen, 13 ml	Beckmann
Zellsiebe, 40 und 70 μm	Falcon

2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Roth, Gibco bzw. Sigma in p.a. Qualität bezogen. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines Wasser aus einer Millipore-Entmineralisierungsanlage verwendet, hier nachfolgend als aqua dest. bezeichnet.

2.1.4 Puffer und Stammlösungen

Digoxigenin (Dig)-Blocklösung	1 Gewichtsprozent (% (w/v)) 'blocking reagent' (Roche), 100 mM Maleinsäure
Dig-Waschpuffer	100 mM Maleinsäure, 150 mM Natrium-Chlorid, pH 7.5, 0.3 Volumenprozent (% (v/v)) Tween 20
MACS-Puffer	0.5% bovines Serumalbumin (BSA), 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in phosphate-buffered saline (PBS), entgast
Prähybridisierungspuffer	5 x Citrat-gepufferte Salzlösung (SSC), 0.1% (w/v) N-Laurylsarkosin, 1% (w/v) 'blocking reagent' (Roche), 0.02% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Southern-Waschpuffer I	2 x SSC, 0.1% (w/v) SDS, pH 7
Southern-Waschpuffer II	0.2 x SSC, 0.1% (w/v) SDS, pH 7
20 x SSC	3 M Natriumchlorid, 300 mM Natriumcitrat, pH7
10 x Tris/Borsäure/EDTA (TBE)-Puffer	890 mM Tris-Salzsäure, pH 7, 890 mM Borsäure, 25 mM EDTA

2.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Medien für die Zellkultur wurden steril bei 4°C aufbewahrt.

PBS wurde von der Apotheke der Medizinischen Einrichtungen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, bezogen.

Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM) wurde als Fertigmedium von Gibco bezogen und mit 2 mM L-Glutamin (Gln; Gibco) und 10% inaktiviertem (56°C, 30 min) fötalem Kälberserum (FCS; PAA) supplementiert.

Iscove`s modified Dulbecco`s medium (IMDM) mit Phenolrot wurde als Trockenpulver von Gibco bezogen, in aqua dest. gelöst und mit 3.024 g/l $NaHCO_3$ (Sigma) sowie 50 μM β-Mercaptoethanol (Sigma) versetzt. Anschließend wurde das Medium über 0.2 μm Membranfilter (Sartorius) sterilfiltriert. IMDM wurde mit 2 mM Gln und 5% FCS supplementiert.

Antibiotika: Penicillin, Streptomycin (Gibco) und Gentamycin (Biochrom) wurden 1%ig im IMDM Medium für die 'mixed leucocyte reaction' (MLR) zugegeben.

2.1.6 Bakterienmedien und Zusätze

Die verwendeten Medien und Festnährböden wurden nach Herstellerangaben angesetzt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.
LB Medium und LB Agar (benannt nach Luria-Bertani) wurden als Trockenpulver von Gibco bezogen. Der Agar und das Medium wurden in aqua dest. gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 55°C wurden erforderliche Antibiotika zugegeben und die Agarplatten gegossen.

Antibiotika: Für transformierte Bakterien wurden Medien mit Antibiotikazusatz verwendet. Ampicillin (Sigma) wurde in einer Konzentration von 100 μg/ml zugegeben.

2.1.7 Zytokine

Muriner GM-CSF wurde als rekombinantes Protein von Genzyme erworben. Als alternative Quelle von murinem GM-CSF wurde der Überstand der transfizierten Plasmozytomzelllinie X63Ag8-653 GM-CSF verwendet (Karasuyama & Melchers, 1988).

2.1.8 Enzyme

Collagenase/Dispase und Desoxyribonuklease (DNase) wurden von Boehringer bezogen.
Die Restriktionsendonukleasen Nco I und Not I wurden von Gibco bezogen. Die RT-PCR wurde unter Verwendung des 'Advantage RT-for-PCR Kits' von Clontech durchgeführt. Die Enzyme wurden, falls nicht anders beschrieben, nach Herstellerangaben und in den mitgelieferten Puffern verwendet.

2.1.9 Antikörper (Ak)

Für die Beurteilung von GM-CSF mittels ELISA wurden folgende monoklonale Antikörper (mAk) der Firma Pharmingen verwendet:

Fänger-Ak:	Ratte α-Maus GM-CSF mAk (Klon MP1-22E9)
Detektions-Ak:	biotinylierter Ratte α-Maus GM-CSF mAk (Klon MP1-31G6)

2.1.10 Molekularbiologische 'Kits'

Zur Anwendung kamen folgende 'Kits': 'Advantage RT-for-PCR Kit ' (Clontech), 'QIAEX II Gel Extraction Kit', 'QIAprep Spin Miniprep Kit' (Quiagen), 'pGEM-T Vector System' (Promega) sowie das 'Dig Oligo 3`-End Labeling Kit' (Boehringer).

2.1.11 Primer und Sonde

Folgende Primer wurden als Lyophilisat von MWG Biotech bezogen, in aqua dest. aufgenommen (Endkonzentration 0.1mM), und bei –20°C aufbewahrt:

Zielsequenz	Primer	Amplifikatgröße
G3PDH*	5`-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC 3`-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	983 bp**
GM-CSF	5`-TGTGGTCTACAGCCTCTCAGCAC 3`-CAAAGGGGATATCAGTCAGAAAGGT	368 bp
CD83	5`-AAGGCCTCCAGCTCCTGTTTCTAGG 3`-CAGAGAGAAGAGCAACACAGCTTCTGC	418 bp
T7 SP6	3`-ATTATGCTGAGTGATATCCCGCT 3`-CATAAGATATCACAGTGGATTTA	
GM-CSF Sonde	5`-AGACCCTGCTCGAATATCTTCAGGCGGGTC-3`	

* Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
** Basenpaare

2.1.12 Tiere

Mäuse der Inzuchtstämme BALB/c und C57BL/6, (C57BL/6 x 129)F2-Hybride und GM-CSF-defiziente Mäuse (GM-CSF$^{-/-}$) auf einem C57BL/6 x 129 Hintergrund (Stanley et al., 1994) wurden in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf gezüchtet.
Tiere beiderlei Geschlechts wurden verwendet. Zur Präparation von Gehirnzellen wurden neugeborene, maximal zwei Tage (d) alte Tiere, für die Milzentnahme und Infektion ca. 3 Monate alte Tiere verwendet.

2.1.13 Zelllinien

L929
Die murine Fibroblastenlinie (Sanford et al., 1948) wurde ursprünglich von der American type culture collection (Rockville, MD, USA) bezogen und mit IMDM kultiviert. Diese Zelllinie produziert konstitutiv Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) (Stanley & Heard, 1977).

D10.G4.1
Der von Kaye et al. etablierte Th_2-Zellklon erkennt Conalbumin als Antigen in Gegenwart H-2^k tragender APC. Die Zellen wurden von der American type culture collection bezogen. Sie wurden in IMDM + 2 mm Gln + 5% FCS + IL2 kultiviert und periodisch mit C57BL/6 Milzzellen (MZ) restimuliert.

X63Ag8-653
Die murine Plasmozytomlinie (De St.Groth & Scheideegger, 1980) wurde ebenfalls von der American type culture collection bezogen und in DMEM + 2 mM Gln + 10% FCS in 75 cm^2 Zellkultur-flaschen so kultiviert, dass eine Zelldichte von ca. 5x10^5 Zellen/ml nicht überschritten wurde.

Toxoplasma gondii
Das verwendete Isolat BK (Winser et al, 1948) wurde aus dem Institut für Medizinische Parasitologie, Universität Bonn, bezogen und in L929 Zellen passagiert. BK Toxoplasmen bilden in Zellkultur ausschließlich das Tachyzoitenstadium.
Das Maus-avirulente Isolat DX (Subtyp II) wurde in BALB/c Mäusen passagiert. Den Mäusen wurden intraperitoneal 3-5 Zysten injiziert, die aus den Gehirnen von 2-6 Monate zuvor infizierten Mäusen präpariert worden waren.

2.1.14 Bakterienstamm und Vektor

Es wurde der *E. coli* Stamm JM109 benutzt (Yanish-Perron et al., 1985). Als Vektor kam pGem-T (Promega) zum Einsatz. Er ist ein 3003 bp großes, linearisiertes Derivat des pGEM-5Zf(+) Vektors.

2.1.15 Software

Das Programm 'DNA-Star' (Lasergene) wurde für die Suche von Primersequenzen und die Auswertung von Sequenzierergebnissen verwendet. 'Graphpad Prism' (Graphpad) wurde zur Auswertung von Proliferationstests und zur Darstellung von 'real-time' PCR Ergebnissen, das Programm 'Easy WIN fitting' (Tecan) für die ELISA-Auswertung verwendet.
Die 'real-time' PCR Analysen wurden mit dem Programm 'Gene Amp 5700' durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellpräparationen

2.2.1.1 Milzzellen (MZ)

Nach der Desinfektion der getöteten Maus mit 70%igem Alkohol wurde auf der linken Seite die Bauchwand freigelegt, in Milzhöhe aufgeschnitten und das Organ nach Abtrennung des Bindegewebes entnommen. In einer Petrischale wurde die Milz zwischen den mattgeschliffenen Flächen zweier steriler Objektträger in eiskaltem IMDM zerrieben. Um Bindegewebsreste und Zellaggregate zu entfernen, wurde die Zellsuspension in einem Spitzbodenröhrchen für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen im Überstand wurden pelletiert (4°C, 10 min, 200 x Erdbeschleunigung (g)) und in 0.83% Ammoniumchlorid resuspendiert, um Erythrozyten zu lysieren. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde die Suspension mit IMDM aufgefüllt, zentrifugiert und anschließend zweimal in IMDM gewaschen. Schließlich wurden die MZ in IMDM aufgenommen und bis zum Gebrauch auf Eis gestellt. Die durchschnittliche Ausbeute pro Maus betrug 1.5×10^6 MZ.
Vor dem Einsatz als APC wurden die MZ in einer ^{137}Cs-Quelle (Gammacell 100 Elite, MDS Nordion) mit einer Dosis von 10 Gy γ-bestrahlt, um ihre Eigenproliferation zu unterdrücken.

2.2.1.2 neonatale Hirnzellen

Um Astrozyten oder Mikroglia zu gewinnen, wurden Hirnzell-Primärkulturen aus neugeborenen, maximal 2 d alten Mäusen angelegt (Frei et al., 1987). Die Tiere wurden in CO_2-gesättigter Atmosphäre getötet und anschließend in 70%igem Alkohol desinfiziert. Nach Abtrennung des Kopfes und dem Entfernen der Schädeldecke wurde das Gehirn entnommen, die Großhirnrinden separiert und unter dem Binokular von den Hirnhäuten befreit. Die Cortexhälften wurden in DMEM mechanisch zerkleinert, indem sie zunächst fünfmal durch eine sterile 10 ml Plastikpipette und anschließend durch die sukzessiv kleiner werdende Öffnung einer Pasteurpipette gezogen wurden, welche durch das Erhitzen über einer Flamme zustande kam. Dieses mehrfache Pipettieren ergab eine Einzelzellsuspension. Nachdem die Suspension über einen 70 µm Filter gegeben wurde, wurden je 10 ml dieser Suspension vorsichtig mit 10 ml Ficoll (Pharmacia) in einem 50 ml Röhrchen unterschichtet und anschließend in diesem Ficoll-Gradienten zentrifugiert (4°C, 10 min, 200 x g, ohne Bremse). Die Interphasezellen, welche die Hirnzellen enthalten, wurden zweimal in DMEM gewaschen und in DMEM in Kultur genommen. Durchschnittlich wurden 3 x 10^6 Hirnzellen pro Tier gewonnen.

2.2.1.3 adulte Hirnzellen

BALB/c Mäuse wurden in Metofane (Janssen) anästhesiert, desinfiziert und nach Öffnung des Brustkorbs und der rechten Herzkammer durch Injektion von 2 x 20 ml eiskaltem PBS in die linke Herzkammer perfundiert. Anschließend wurde das Gehirn entnommen und mit 0.5 ml DMEM versetzt, mit einer Schere zerkleinert und dann nach Zugabe weiterer 2.5 ml DMEM mehrmals durch eine 18 gauge-Kanüle gespült. Das Gewebe wurde dann mit 0.3 U/ml Collagenase/Dispase und 0.2 mg/ml DNAse I für jeweils 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in kaltem Medium resuspendiert und durch ein 70 µm Sieb gegeben. In Abwandlung der von Sedgwick et al., 1991 beschriebenen Methode wurden die Zellen in einem 30%/60% Percoll-Gradienten 25 min bei 1000 x g zentrifugiert. Die Interphase, welche die mononukleären Hirnzellen enthält, wurde gesammelt und in DMEM gewaschen. Erythrozyten im Pellet zeigten eine insuffiziente Perfusion an. Aus uninfizierten Tieren wurden durchschnittlich 0.3 x 10^6 Hirnzellen und aus infizierten Tieren bis zu 6 x 10^6 Hirnzellen gewonnen. Für die Präparation von Ribonukleinsäure (RNA) wurden je drei Tiere pro Gruppe präpariert.

2.2.1.4 *Toxoplasma gondii*-Hirnzysten

Für Infektionsversuche in vivo wurden BALB/c Mäuse mit *Toxoplasma gondii*-Zysten (Stamm DX) aus chronisch infizierten Tieren verwendet. BALB/c Mäuse wurden in CO_2 getötet und anschließend das Gehirn präpariert. Nach Zugabe von 5 ml PBS in eine Petrischale und grobem Zerkleinern mit einer Schere wurde das Gehirn durch sukzessiv kleiner werdende Kanülen gesaugt (18, 20, 22 gauge) und die Zysten nach Zugabe weiterer 5 ml PBS durch eine Zentrifugation gewaschen. Nach Resuspension des Pellets in 15 ml PBS wurde die Suspension mit 10 ml Ficoll unterschichtet, zentrifugiert (4°C, 25 min, 250 x g, ohne Bremse) und dann die im Pellet enthaltenen Zysten noch zweimal in PBS gewaschen. Mäuse wurden mit je 5 Zysten intraperitoneal infiziert.

2.2.2 Aufreinigung von Zellpopulationen

2.2.2.1 Isolierung CD11c-positiver Zellen mit paramagnetischen 'beads'

Dieses Verfahren kam bei der Isolation von $CD11c^+$ MZ, der Trennung von $CD11c^+$ und $CD11c^-$ Zellen aus dem adulten Gehirn bzw. aus Hirnzell-Primärkulturen zur Anwendung. Dabei wurden $CD11c^+$ Zellen mittels CD11c (N418)-markierter magnetischer 'beads' (Milteny Biotec) positiv selektioniert. Zunächst wurden die MZ bzw. Hirnzellen in 20 ml MACS-Puffer aufgenommen und durch ein 40 µm Sieb gespült. Nach Zentrifugation (10 min, 300 x g) wurden 10^8 Zellen in 30 µl der 'beads' und 120 µl des MACS-Puffers aufgenommen und für 15 min bei 4°C inkubiert. Um überschüssige 'beads' auszuwaschen wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml MACS-Puffer zentrifugiert. Eine sich in einem Magnetfeld befindende MACS-Säule (Milteny Biotec) wurde mit 2 x 500 µl MACS-Puffer gespült und anschließend die Zellen in 500 µl MACS-Puffer über die Säule gegeben. Nachdem die Zellsuspension die Säule passiert hatte, wurde mit 3 x 500 µl Puffer gespült, die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die $CD11c^+$ Zellen dann außerhalb des Magnetfeldes eluiert. Fluorescence activated cell sorter (FACS)-Analysen (Daten nicht gezeigt) ergaben eine Reinheit von >90% für $CD11c^+$ Zellen.

2.2.2.2 T-Zell-Reinigung über Nylonwolle und FcR/anti-Ig-Säule

Als 'Responder'-Zellen in der MLR wurden naive T-Zellen aus C57/BL6 Mäusen durch allogene Hirnzellen bzw. MZ aus BALB/c Mäusen zur Proliferation gebracht und anhand der T-Zellproliferation die Antigenpräsentationsfunktion dieser Zellen

ermittelt. Die benötigte Reinheit der T-Zellen wurde durch zwei hintereinander geschaltete Reinigungssysteme gewährleistet. Zunächst wurde eine Nylonwollsäule gestopft (2 g Nylonwolle pro 20 ml Säule) und autoklaviert. Anschließend wurde diese Säule mit IMDM für 45 min bei 37°C äquilibriert und danach mit der Milzzellsuspension für weitere 45 min bei 37°C inkubiert (Hathcock, 1991). Dann wurden die T-Zellen mit 20 ml IMDM/Säule eluiert, zentrifugiert (200 x g) und in 1 ml Säulenpuffer auf die T-Zell 'enrichment column' (R & D Systems, Minneapolis) gegeben. Diese wurde zuvor äquilibriert, um Ig- und FcR-positive Zellen zu eliminieren und damit die Reinheit der T-Zellen zu steigern. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in IMDM auf Eis gestellt. Aus einer Milz wurden durchschnittlich 5-6 x 10^6 T-Zellen gereinigt.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Nach Anfärbung mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau (Sigma) wurde in einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl lebender Zellen mikroskopisch ermittelt. Tote Zellen, deren Membran der Farbstoff durchdringt, färben sich blau, intakte Zellen verfärben sich nicht.
Ein Alliquot der Zellsuspension wurde mit einer physiologischen Trypanblau-Lösung verdünnt und die Zellzahl (ZZ) der Suspension wie folgt berechnet:
ZZ in 16 Quadranten x Verdünnungsfaktor x 10^4 (Kammerkonstante) = ZZ/ml.

2.2.4 Zellkultur

Zellkulturen wurden in CO_2-begasten Brutschränken bei 37°C, 10% CO_2-Atmosphäre und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellkulturmedien waren den Wachstumsbedürfnissen der Zellen entsprechend unterschiedlich zusammengesetzt.

2.2.4.1 Hirnzell-Primärkultur

Neonatale Hirnzellen wurden, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, präpariert und in einem Flüssigkultursystem kultiviert. Ausgesät wurden die Zellen in Mehrfachkulturschalen in einer Dichte von 1 x 10^6 in 6 well-Platten oder 2.5 x 10^5 in 24 well-Platten. Das Kulturmedium war DMEM. Durch Erneuerung des Mediums am 4. und 7. Tag (6 well-Platten) bzw. am 2. und 5. Tag (24 well-Platten) der Kultur wurden die nicht adhärenten Zellen ausgewaschen. Nach acht bis zehn Tagen (6 well-Platten) bzw.

nach fünf bis sechs Tagen (24 well-Platten) war ein Astroglia-Zellrasen entstanden. Die 6 well-Kulturen kamen entweder direkt zur Gewinnung von RNA zum Einsatz oder dienten als Stimulatorzellen in der MLR. Für den Einsatz von Mikrogliazellen in der MLR wurden die Zellen weiterkultiviert. Einem Teil der Kulturen wurde zur Stimulierung des Mikrogliawachstums das Zytokin GM-CSF (1.35 ng/ml) zugesetzt, die anderen wurden unbehandelt gelassen. Nach ca. sieben Tagen, nachdem eine deutliche Proliferation von Mikrogliazellen unter dem Einfluss von GM-CSF stattgefunden hatte und Zellen mit der Morphologie unreifer DC sichtbar waren, wurden diese Zellen geerntet. Dazu wurden die Kulturschalen 10 min auf Eis inkubiert und die Mikrogliazellen anschließend mit einer Pipette von der Kulturschale abgespritzt. Die Zellen wurden gezählt und in ihrer Gesamtheit oder nach Auftrennung mit dem MACS-System für 24 Stunden (h) in eine Sekundärkultur mit GM-CSF gegeben und dort mit LPS (1 µg/ml) oder löslichem CD40 Ligand (sCD40L, 10 µg/ml) und kreuzvernetzendem Ak (Alexis) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Der sCD40L ist ein Transmembranprotein der TNF Familie.
Die 24 well-Kulturen wurden für die Infektion in vitro benutzt und nicht abgeerntet. Nachdem ein Teil der Kultur ebenfalls für vier Tage mit GM-CSF (1.35 ng/ml) inkubiert wurde, wurden diese Kulturen mit BK-Toxoplasmen infiziert. Kontrollen blieben uninfiziert.

2.2.4.2 Kultivierung von *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten

Das *Toxoplasma gondii* Isolat BK wurde in L929 Fibroblasten kultiviert. Die Fibroblasten wurden im Verhältnis von 10 Parasiten/Wirtszelle infiziert. Unter diesen Bedingungen dauerte ein Infektionszyklus, der mit der Lyse der Wirtszellen endet, etwa drei Tage. Danach wurden etwa sechs mal so viele Toxoplasmen geerntet wie zur Infektion verwendet worden waren. Die Toxoplasmen wurden durch zwei differentielle Zentrifugationsschritte (5 min, 50 x g, und 15 min, 600 x g bei RT) weitgehend von Zellresten befreit. Nach der ersten Zentrifugation befinden sich die Toxoplasmen im Überstand und nach der zweiten Zentrifugation im Pellet. Anschließend wurden die Toxoplasmen gezählt und zur Infektion von Hirnzellkulturen verwendet.

2.2.4.3 Kultur transfizierter X63Ag8-653 GM-CSF Plasmozytomzellen

Die Zelllinie (Karasuyama & Melchers, 1988) wurde mit DMEM in 75 cm^2 Zellkulturflaschen so kultiviert, dass eine Dichte von 5 x 10^5 Zellen/ml nicht

überschritten wurde. Diese Zelllinie sezerniert konstitutiv GM-CSF. GM-CSF wurde nach Zentrifugation im Überstand erhalten.

2.2.5 ELISA zur Bestimmung von GM-CSF

Zum quantitativen Nachweis von GM-CSF in Kulturüberständen transfizierter Plasmozytomzellen diente die Methode des ELISA. Der ELISA ist nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut.
Zur Durchführung wurden die Testplatten mit 100 µl/well Primärantikörper (Fänger-Ak) in einer Konzentration von 2 µg/ml über Nacht bei 4°C angelagert. Nach Ausschlagen der Lösung wurden freie Bindungsstellen der Platten durch Zugabe von 200 µl/well Blockpuffer (1% BSA in PBS) abgesättigt. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT. Der Blockpuffer wurde durch Ausschlagen der Platte entfernt. 100 µl/well des zu testenden Hybridomüberstands bzw. des rekombinaten GM-CSF Standards, von dem zuvor eine Verdünnungsreihe in Blockpuffer angefertigt wurde, wurden zupipettiert. Nach zweistündiger Inkubationszeit bei 37°C wurden die Platten fünfmal mit 200 µl/well Waschpuffer gewaschen und 100 µl/well des Sekundärantikörpers (Detektions-Ak) in einer Konzentration von 2 µg/ml für 1 h bei 37°C zugegeben. Die Platten wurden anschließend gewaschen und ausgeschlagen, bevor 100 µl/well Avidin-Peroxidase für 20 min zupipettiert wurde.

Anschließend wurden pro well 100 µl Tetramethylbenzidin zugegeben, welches innerhalb von 5 min enzymatisch umgesetzt wurde. Der Prozeß wurde durch Zugabe von 100 µl/well 1 M H_2SO_4 gestoppt und die Färbung des Substrates im ELISA-Photometer bei 450 nm gemessen. Als Blindwert wurde anstelle der zu testenden Antikörperlösung PBS eingesetzt.
Zur Auswertung der ELISA-Daten wurde die Software 'Easy WIN fitting' (Tecan) verwendet.

2.2.6 Proliferationstests

Nach Stimulation der T-Zellen durch Allo-Antigen werden diese zur Proliferation aktiviert. Unter Ausnutzung der Tatsache, dass der Teilung der Zellen die Replikation der Desoxyribonukleinsäure (DNA) vorausgeht, werden die Zellen mit radioaktiv markiertem Thymidin inkubiert, das in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Die Bestimmung der DNA-gebundenen Radioaktivität gibt somit Aufschluss über die

Stärke der induzierten Proliferation und wird als Maß der Aktivierung einerseits und der Antigenpräsentationsleistung der verwendeten akzessorischen Zellpopulationen andererseits herangezogen.

Das Toxoplasmenwachstum in Wirtszellkulturen wurde selektiv über die Inkorporation von ^{3}H-Uracil in parasitäre DNA und RNA bestimmt (Pfefferkorn & Pfefferkorn, 1977). Im Gegensatz zu Säugerzellen besitzen Toxoplasmen die Uracil-Phosphoribosyltransferase und sind in der Lage, externes Uracil direkt für die Nukleotidsynthese zu verwenden.

2.2.6.1 Proliferation alloreaktiver T-Zellen

Prinzipiell wurden in der MLR die in 2.2.4.1 beschriebenen Zellen der Sekundärkultur hinsichtlich ihrer Fähigkeit naive T-Zellen zu stimulieren untersucht. Dieser Test beruhte auf der Erkennung fremder MHC-Moleküle, vergleichbar einer Transplantat-abstoßung. Dazu wurden zwei verschiedene Mausstämme benötigt. Die Gliakultur-zellen stammten aus BALB/c und die T-Zellen aus C57/BL6 Mäusen. Die T-Zellen waren naiv, dass heißt sie erkannten das fremde MHC-Molekül als Antigen zum ersten Mal in diesem Test. Kontrollen lieferten Ansätze ohne T-Zellen. Zusätzlich wurde die Eigenproliferation der T-Zellen ohne Antigen bestimmt.
In 96A/2-well-Mikrotiterplatten wurden pro well 1.2 x 10^5 T-Zellen mit bestrahlten MZ oder Mikrogliazellen titriert von 312 bis 5000 in 150 µl IMDM + 1% Gentamycin/Penicillin/Streptomycin ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen im Brutschrank wurden 50 µl frisches Medium zugegeben und diese Kulturen für weitere 18 h mit ^{3}H-Thymidin (7.4 kBq/well) pulsmarkiert. Der Zeitpunkt der Thymidinzugabe war so gewählt, dass die stimulierten Zellen sich in einer deutlichen Proliferationsphase befanden. Anschließend wurden die Kulturplatten bei –20°C eingefroren.

2.2.6.2 Intrazelluläres Toxoplasmenwachstum

Für den Test wurden neonatale Hirnzellen aus GM-CSF defizienten Kulturen und dem Wildtyp in 24 well-Platten (2,5 x 10^5/well) eingesät. Diese Primärkultur wurde, wie in 2.2.4.1 beschrieben, nach vier Tagen, zum Zeitpunkt der Konfluenz mit GM-CSF stimuliert und ein Teil unbehandelt gelassen. Nach vier weiteren Tagen wurden frisch präparierte BK-Toxoplasmen im Verhältnis 3:1 zugegeben, Kontrollen blieben uninfiziert.

In Erweiterung des Experiments wurden Hirnzellen aus einer Primärkultur GM-CSF defizienter Tiere im Verhältnis 1:1 mit BK-Toxoplasmen infiziert. In Parallelkulturen waren die Zellen zwei Tage mit GM-CSF vorbehandelt worden, unbehandelt gelassen oder es wurden zusammen mit den Toxoplasmen in gleicher Zahl $CD11c^+$ Mikrogliazellen aus mit GM-CSF supplementierter Vorkultur in einem 'transwell' zugegeben. Nach 48 h wurde die intrazelluläre Proliferation der Toxoplasmen über den Einbau von ^{3}H-Uracil gemessen.
Nach 48 h, zum Zeitpunkt einer 50%igen Zelllyse der Wirtszellen, wurden die Kulturen mit ^{3}H-Uracil (1233 kBq/well) für weitere 24 h markiert. Anschließend wurden die Testplatten bei –20°C eingefroren. Dabei werden die Zellmembranen zerstört und die Nukleinsäuren freigesetzt.

2.2.6.3 Szintillationsmessung der Thymidin- bzw. Uracil-Inkorporation

Zur Auswertung wurden die Testplatten aufgetaut und der Inhalt der wells mit Hilfe eines Erntegerätes (LKB cell harvester) abgesaugt. Hierzu mussten die Zellen aus den 24 well-Platten zunächst in 96 well-Platten transferiert werden. Die Flüssigkeit passiert einen Glasfaser-Filter (Wallac), an dem DNS-Fragmente adsorbieren. Die Filter wurden getrocknet (120°C, 20 min), mit je 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Betaplate Scint, Wallac) getränkt und einzeln in eine Plastikfolie eingeschweißt. Dem Inhalt der Testkulturen entsprechende Felder wurden mit dem Flüssigkeitszintillations-Zählgerät abgetastet. Die Summe der gezählten 'counts per minute' (cpm) ist proportional zur ^{3}H-Thymidin bzw. ^{3}H-Uracil Einbaurate der Zellen. Für jede Versuchsbedingung wurden Dreifachbestimmungen angelegt, als Ergebnis ist das arithmetische Mittel der Einzelwerte angegeben.

2.2.7 Analyse der Gen-Expression

2.2.7.1 Präparation von RNA

Beim Arbeiten mit RNA ist eine Kontamination mit RNA-degradierenden Enzymen, den Ribonukleasen zu vermeiden. Diese Enzyme zeichnen sich durch extreme Thermostabilität sowie eine große Unempfindlichkeit gegenüber verschiedenen chemischen Agenzien aus. Um Kontaminationen möglichst gering zu halten, sind besondere Vorkehrungen zu treffen. Benötigte Plastik- und Glaswaren wurden autoklaviert. Ebenso wurden Puffer und Lösungen vor Gebrauch autoklaviert bzw. mit autoklaviertem Wasser angesetzt und soweit wie möglich mit dem Ribonuklease-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) 0,1%ig versetzt. Dieser wurde durch

Autoklavieren wieder entfernt. Während der Arbeit mit RNA wurden Handschuhe getragen.
Gesamt-RNA wurde aus Hirnzellkulturen und adulten Hirnzellen gemäß der Methode nach Chirgwin et al., 1979 präpariert. RNA weist die größte Dichte aller Zellkomponenten auf (**>** 1.9 g/cm^3). Dies wird bei der Zentrifugation im Cäsiumchlorid-Gradienten, mit dem Dichten von bis zu 1.9 g/cm^3 eingestellt werden können, genutzt, um ausschließlich RNA zu pelletieren und damit zu isolieren.
Drei Millimeter einer Cäsiumchlorid-Lösung (5.7 M Cäsiumchlorid, 0.1 M EDTA, 0.1% (v/v) DEPC, pH 8) wurden in ein Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt. Auf Eis wurden 2×10^6 Hirnzellen in 4 ml Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung (4 M Guanidinium-Isothiocyanat, 20 mM Na-Acetat, 0.1 mM Dithiothreitol, 0.5% (w/v) N-Laurylsarkosin, pH 5.2) homogenisiert. Nach Zugabe von 3 ml DEPC-H_2O (0.1% (v/v) DEPC in H_2O) wurde die Suspension auf das Cäsiumchlorid-Kissen gegeben und in der Ultrazentrifuge (150000 x g, 16 h, RT, ohne Bremse) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Boden des Zentrifugenröhrchens mit einer heißen Skalpellklinge abgetrennt. Das Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und dann an der Luft getrocknet. Die RNA wurde schließlich in 20 µl DEPC-H_2O aufgenommen.
Zur Mengenbestimmung der RNA wurde ein Aliquot der RNA-Probe in DEPC-H_2O verdünnt, gemischt und in eine Quarzküvette gegeben. Die optische Dichte (OD) bei der Wellenlänge 260 nm gegen aqua dest. wurde bestimmt. Bei dieser Wellenlänge adsorbieren vorwiegend Nukleinsäuren. Eine OD bei 260 nm entspricht ca. 40 µg RNA. Die Kontamination mit Protein wurde über den Quotienten OD_{260}/OD_{280} kontrolliert. Für reine RNA liegt dieser Wert bei 1.6.

2.2.7.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Aus RNA von kultivierten oder ex vivo isolierten Hirnzellen wurde mit dem 'Advantage RT-for-PCR Kit' (Clontech) komplementäre DNA (cDNA) hergestellt und amplifiziert. Mit diesem Kit wird die Erststrang-Synthese durch die 'Moloney-Murine Leukemia Virus' Reverse Transkriptase katalysiert. Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg gesamt RNA eingesetzt und das Protokoll des Herstellers befolgt. Die PCR wurde in 50 µl Ansätzen laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt 36.6 µl steriles Wasser, 5 µl PCR-Puffer (Clontech), 1 µl dNTP (je 10 mM, Clontech), 5 µl cDNA, 0.4 µl DNA-Polymerase (Clontech) und 2 µl Primer (je 0.1 mM). Die Amplifikationen erfolgten im Thermocycler. Nach Denaturierung bei 94°C für 3 min wurde die DNA in 30 Zyklen amplifiziert. Ein Zyklus bestand aus drei Schritten:

(1) 45 sec 94°C, (2) 45 sec 58°C, (3) 90 sec 72°C. Im letzten Zyklus wurde der Elongationsschritt bei 72°C um 7 min verlängert.
Die optimale 'Annealing'-Temperatur wurde durch einen Lauf im Gradienten-Thermocycler ermittelt. Es wurde stets eine Positivkontrolle mit einem 'Template' bekannter Sequenz, sowie eine Negativkontrolle ohne 'Template' mitgeführt.

2.2.7.3 'real-time' Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bis vor kurzem wurden Techniken wie die PCR zur Detektion von DNA und RNA benutzt. Es ist jedoch schwierig, die exakte Menge des amplifizierten Produktes zum Endpunkt der Analyse in der herkömmlichen PCR zu bestimmen. Die 'real-time' PCR ist zur exakten und reproduzierbaren Bestimmung von DNA-Mengen geeignet, da sie auf der Bestimmung der treshold cycles (C_T)-Werte in der exponentiellen Phase der PCR basiert. Die Quantifizierung fand durch das Messen der Fluoreszenzsteigerung durch das Binden von SYBR Green an doppelsträngige DNA statt. Die Detektion der Fluoreszenz wurde mit dem 5700 (ABI-Prism) Thermalcycler durchgeführt.
Der PCR Standard bestand aus bekannten Kopienanzahlen des gereinigten PCR-Produktes und es wurden die C_T-Werte der unbekannten Probe mit der Standardkurve verglichen. Die Kopienzahl der Standardprobe, die wie unter 2.2.7.4 beschrieben aus $CD11c^+$ MZ gewonnen wurde, wurde ermittelt nach folgender Formel:

$$\text{Kopien/ml} = \frac{N_0 \times C \times OD_{260}}{MW}$$

Mit C = Konzentration/ml, OD = optische Dichte, MW = Molekulargewicht des PCR-Produktes

Der Standard wurde in einer Verdünnungsreihe (1:3) von 10^7 bis 508 Kopien/5 µl eingesetzt. Die Proben für die 'real-time' PCR wurden analog zu denen der PCR gewonnen und eingesetzt. Ebenso wurden die unter 2.1.11 beschriebenen CD83 Primer (je 3 µmol) eingesetzt.
Die 'real-time' PCR Ansätze wurden wie im Protokoll (Applied Biosystems) beschrieben, mit dem SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), den beiden Primern und der Probe in 96 well-Patten (Applied Biosystems) angesetzt und mit Caps (Applied Biosystems) verschlossen. Während des Ansetzens sind ein sauberer Laborkittel und Handschuhe zu tragen und es ist auf kontaminationsfreies Arbeiten zu achten.
Für jede Analyse wurde eine Standardkurve bereitet und alle zu vergleichenden Proben in ein und demselben Lauf verglichen.

Die Zyklenparameter waren folgendermaßen:

1 x 2 min 50°C (Amp Erase UNG Inkubation)
1 x 10 min 95°C (Ampli Taq Gold Aktivierung)

40 x 15 sec 95°C (Melt)
1 min 60°C (Anneal/Extend)

Nach der PCR Amplifikation wurden die Daten mit der 'Gene Amp 5700' Software ausgewertet. Die Fluoreszenzintensität wird gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Der C_T-Wert ist der erste Zyklus bei dem ein statistisch signifikanter Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen ist. Der Treshhold wird dann so gelegt, dass er sich dort befindet, wo ein exponentielles Wachstum des PCR Produktes zu verzeichnen ist. Anschließend analysiert das Programm die den Proben entsprechende Kopienzahl im Vergleich zu der Standardkurve automatisch. Die so erhaltenen Kopienzahlen wurden dann in 'Graph Pad Prism' dargestellt.

2.2.7.4 Plasmidpräparation

Zur Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurden nach abgeschlossener Elektrophorese des ethidiumbromidhaltigen Agarosegels unter UV-Licht Gelbereiche mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden gewogen und danach die DNA mit dem 'QIAEX II Gel Extraction Kit' (Qiagen) eluiert. Abschließend erfolgte eine Fällung der DNA und Aufnahme in 20 µl Tris-Puffer 10 mM, pH 8.5.
Ligationsreaktionen von DNA-Fragmenten in Klonierungsvektoren wurden unter Verwendung der T4-DNA-Polymerase (Promega) durchgeführt. PCR-Amplifikate weisen häufig zusätzliche Desoxyadenosine an ihren 3`-Enden auf, die unabhängig vom jeweiligen 'template' durch die Taq DNA-Polymerase addiert werden, da diese keine 3` $\rightarrow$ 5` Exonucleaseaktivität aufweist. Die Ligation solcher Amplifikate in den pGEM-T Klonierungsvektor wurde gemäß dem Herstellerprotokoll mit dem pGEM-T Vector System (Promega) durchgeführt.
Hierzu wurden 50 ng des Vektors zusammen mit dem zu ligierenden DNA-Fragment gefällt, wobei die Menge des zugegebenen Inserts so eingestellt wurde, dass ein molares Verhältnis von 3:1 zwischen Insert und Vektor gegeben war. Das Pellet wurde in 5 µl 2 x Rapid Ligation Buffer (Promega) aufgenommen und nach Zugabe von 3 U T4-DNA-Ligase mit aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht. Die Ligation fand über Nacht bei 4°C statt.

Zur Transformation der kompetenten *E. coli* Bakterien (Stamm JM109) wurde nach den Angaben des Herstellers (Promega) verfahren. 50 µl der auf Eis aufgetauten, kompetenten Bakterien wurden in ein vorgekühltes, steriles 1.5 ml Eppendorf-Gefäß mit 2 µl des Ligationsansatzes gegeben, vorsichtig geschwenkt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzepuls für 45 Sekunden im Wasserbad bei 42°C und eine weitere Inkubation der Zellen auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 950 µl LB-Medium wurde der Ansatz unter Schütteln (150 rpm) für 1.5 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden je 100 µl auf Ampicillin-supplementierten Agarplatten ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert, bis Einzelkolonien zu erkennen waren.
Der Test auf Bakterienkolonien, die das gewünschte DNA-Insert enthielten, fand in der PCR statt. Hierbei wurden die für das DNA-Insert spezifischen Primer für CD83 verwendet. Die einzelnen Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze berührt und diese dann in Kontakt mit einem 0.5 ml Reaktionsgefäß gebracht, in welchem die PCR durchgeführt wurde. Dieselbe Spitze wurde ebenfalls zum Überimpfen der Bakterienkolonie in 3 ml Ampicillin-supplementiertes LB-Medium gebraucht. Die PCR-Reaktionsansätze wurden schließlich im Agarosegel auf Amplifikate der erwarteten Länge überprüft und die positiven Bakterienkulturen weiterkultiviert.
Zur Anzucht von Übernachtkulturen wurden Einzelkolonien von einer LB-Platte in 3 ml LB-Medium überimpft und auf dem Schüttler über Nacht bei 37°C inkubiert.
Plasmid-DNA aus Übernacht-Bakterienkulturen wurden unter Verwendung des 'QIAprep Spin Miniprep Kit' (Qiagen) isoliert. Es wurde pro Ansatz 3 ml Bakterienkultur bei 10000 x g in der Tischzentrifuge pelletiert. Danach wurde das Standardprotokoll des 'kits' durchgeführt. Pro Ansatz wurden durchschnittlich 25 µg Plasmid-DNA gewonnen.
Plasmid-DNA wurde in aufgereinigter Form zu GATC geschickt und dort sequenziert.

2.2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der DNA wurde ein 1.5%iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 1.5 g Agarose (Biozym) in 100 ml 1 x TBE Puffer gegeben und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid zupippetiert (Endkonzentration: 0.5 µg/ml) und gut gemischt. Die Agarose wurde in einen abgedichteten Gelträger gegossen und die Startkanäle für die DNA-Proben mit einem Kunststoffkamm ausgespart. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt, dessen Kammer mit 1 x TBE gefüllt wurde bis das Gel etwa 2 mm bedeckt war. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 6 V/cm in 1 – 2 h aufgetrennt. Ein DNA-Längenstandard (1 kb ladder; Gibco) wurde mitgeführt. In die DNA interkalierte

Ethidiumbromidmoleküle wurden durch UV-Licht (340 nm) zur Fluoreszenzemission angeregt und damit die DNA detektiert (Sharp et al., 1973). Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

2.2.7.6 Southern Blot

In Agarosegelen aufgetrennte DNA wurde nach der Methode von Southern (Southern, 1975) auf eine Nylonmembran aufgetragen und dort durch UV-Bestrahlung fixiert. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel 45 min in Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) und nach Waschen in aqua dest. 45 min in Neutralisierungslösung (0.5 M Tris-HCL, pH 7.5, 3 M NaCl) geschwenkt. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran fand über Nacht in einer Kapillarblotkammer statt, wobei als Transferpuffer 10 x SSC verwendet wurde. Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran an der Luft getrocknet und danach die DNA durch UV-Bestrahlung mit 0.6 J/cm^2 auf der Membran immobilisiert.
DNA-DNA-Hybridisierungen wurden nach der Vorschrift im 'Dig Oligo 3`-End Labeling Kit' (Roche) durchgeführt. Die Sonde ist ein Oligonukleotid, welches mit dem 'Dig Oligo 3`-End Labeling Kit' markiert wurde. Dabei wird ein Dig-dUTP Molekül durch eine terminale Transferase an das 3'-Ende eines Oligonukleotids gekoppelt.
Die Nylonmembranen wurden zunächst für 1 h bei 68°C in Prähybridisierungspuffer geschwenkt. Pro 100 cm^2 Membran wurden 30 ml Prähybridisierungspuffer verwendet. Zur Herstellung der Hybridisierungslösung wurde die Dig-dUTP-markierte Sonden-DNA zunächst für 5 min bei 95°C denaturiert und danach rasch auf Eis abgekühlt. Pro 1 ml Prähybridisierungspuffer wurden 10 µl der Sonden-DNA eingesetzt. Die Hybridisierung fand über Nacht im Wasserbad bei 68°C statt und es wurden pro 100 cm^2 Membran 4 ml Hybridisierungslösung verwendet. Nach Hybridisierung wurde die Membran bei RT 2 x 5 min in Southern-Waschpuffer I und danach bei 68°C 2 x 15 min in Southern-Waschpuffer II von nicht gebundener Sonde befreit. In Vorexperimenten war die SSC-Konzentration im Southern-Waschpuffer II optimiert worden. Mit 0.2 x SSC wurde der beste Kompromiss zwischen Stringenz des Waschens und Intensität des Hintergrundes bei der abschließenden Chemilumineszenzdetektion erzielt.
Nach Hybridisierung der DNA-Sonde wurde die Membran zunächst in Dig-Waschpuffer äquilibriert. Danach erfolgte eine Inkubation in Dig-Blocklösung auf dem Schüttler für 30 min bei RT. Nach einer Inkubation von 30 min mit dem in Dig-Blocklösung verdünnten α-Dig-Ak (1:10000) wurde die Membran 2 x 15 min in Dig-Waschpuffer geschwenkt. Es folgte eine Inkubation in 1%igem Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2'-dioxetane 3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.3,7] decan} -4-yl) phenyl

phosphat (CSPD)-Star (1% CSPD-Star, 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5) für 5 min. Die Membran wurde kurz auf Whatman-Papier gelegt, in Frischhaltefolie eingewickelt, der Röntgenfilm aufgelegt und nach 2-5 min Exposition entwickelt.

2.3 Statistik

Zur Berechnung statistischer Signifikanzen wurde der 'Student´s-Test' für normalverteilte Stichproben eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Gewinnung von GM-CSF aus transfizierten Plasmozytomzellen

Signale aus der Mikroumgebung gelten als Ursache für morphologische Veränderungen der Mikroglia, die mit einem veränderten Funktionszustand korrelieren (Streit et al., 1988). Im ZNS kann GM-CSF unter anderem von Astrozyten und Endothelzellen produziert werden (Hao et al., 1990; Malipiero et al., 1990, Metcalf, 1989) und ist als Mikroglia-Wachstumsfaktor beschrieben (Alliot et al., 1991; Frei et al., 1987; Giulian & Ingemann, 1988). In der vorliegenden Arbeit wurde GM-CSF hinsichtlich des Einflusses auf die Antigenpräsentationsleistung von Hirnzellen und bezüglich der antiparasitären Aktivität untersucht. Das hierzu benötigte GM-CSF wurde aus X63Ag8-653 Plasmozytomzellen (Karasuyama & Melchers, 1988) gewonnen und die Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Als Standard wurde gereinigtes GM-CSF titriert. Messungen ergaben für den abzentrifugierten Überstand eine durchschnittliche Konzentration von 135 ± 25 ng/ml (Mittelwert ± standard deviation (SD)).

3.2 Differenzierung von DC aus Mikroglia

3.2.1 GM-CSF stimuliert die Entwicklung unreifer DC aus Mikroglia

In Hirnzell-Primärkulturen entwickelt sich zunächst ein Zellrasen adhärenter Astrozyten und darauf anschließend die mehr sphärischen Mikrogliazellen, die typische verzweigte Morphologien zeigen (Frei et al., 1987).
Um selektiv die Entwicklung der Mikroglia zu stimulieren, wurde das Standardprotokoll (Frei et al., 1987) modifiziert, indem zum Zeitpunkt der Konfluenz nach ein bis zwei Wochen die Kulturen mit GM-CSF (1%) supplementiert wurden. Damit wurde die Mikroglia-Ausbeute im Vergleich zu unbehandelten Kulturen (4×10^4 Zellen) um das 10-fache gesteigert ($2.5 - 4.5 \times 10^5$ Zellen). Neben der Mikroglia-Ausbeute kam es auch zur Entwicklung von $CD11c^+$ (ca. 60% der Zellen) Mikrogliazellen, die phänotypische Charakteristika unreifer DC aufweisen (Fischer & Bielinsky, 1999). Dass diese Zellen noch unreif sind kann man daran erkennen, dass sie nicht fähig sind T-Zellen antigenspezifisch zur Proliferation zu stimulieren

(Abb. 4). Im Gegensatz dazu ist diese Funktion nach Stimulation mit sCD40L voll ausgebildet.

3.2.2 LPS oder CD40-Ligation induzieren eine funktionelle Ausreifung

Da Mikrogliazellen aus Hirnzell-Primärkulturen unreifen DC funktionell und phänotypisch gleichen, wurde geprüft, ob sich aus ihnen reife DC entwickeln können. GM-CSF ist als Mikroglia-Mitogen und als Differenzierungsfaktor für DC-ähnliche Zellen aus Hirnzellkulturen beschrieben (Fischer & Bielinsky, 1999; Aloisi et al., 2000a). GM-CSF wird im murinen ZNS bei EAE und Toxoplasmose früh zu Beginn der Enzephalitis exprimiert (Gazzinelli et al., 1994, Hunter et al., 1992, Lyons et al., 1999). Unreife DC prozessieren Antigen und reifen unter dem Einfluss mikrobieller Stimuli wie LPS, von Zytokinen wie TNFα oder durch die Bindung von CD40 Ligand auf T-Zellen zur reifen DC (Banchereau & Steinman, 1998).

Als funktioneller Parameter der Reifung von DC wurde ihre Fähigkeit, naive T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren, getestet. Es sollte zum einen untersucht werden, ob es sich bei $CD11c^+$ Mikrogliazellen um funktionell unreife DC handelt und zum anderen sollte ihre Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen vergleichend zu $CD11c^-$ Mikrogliazellen untersucht werden.

Hierzu wurden $CD11c^+$ und $CD11c^-$ Hirnzellen aus mit GM-CSF supplementierter Hirnzell-Primärkultur neonataler BALB/c Mäuse mittels MACS isoliert bzw. ein Teil der Zellen nicht separiert. Für eine maximale Aktivierung der in den Testzellpopulationen enthaltenen DC waren alle drei Populationen in einer 24-stündigen Sekundärkultur mit GM-CSF mit sCD40L und einem kreuzvernetzendem Ak inkubiert worden. Anschließend wurden die Zellen in der MLR mit oder ohne T-Zellen für insgesamt 4 Tage inkubiert. Die Proliferation wurde während der letzten 24 h gemessen.

Die Auswertung der Thymidininkorporation ergab, dass die $CD11c^+$ Mikrogliazellen ähnlich wie die Referenz-DC aus der Milz eine proliferative Aktivität naiver T-Zellen induzieren. (Abb. 3), während $CD11c^-$ Mikroglia keine und Gesamt-Mikroglia nur eine geringe allostimulatorische Fähigkeit zeigt. Kontrollen ohne T-Zellen ergaben keine Proliferation (cpm < 100). Damit wurde gezeigt, dass die $CD11c^+$ Mikrogliazellen nach geeigneter Stimulation ähnlich wie DC naive T-Zellen aktivieren können.

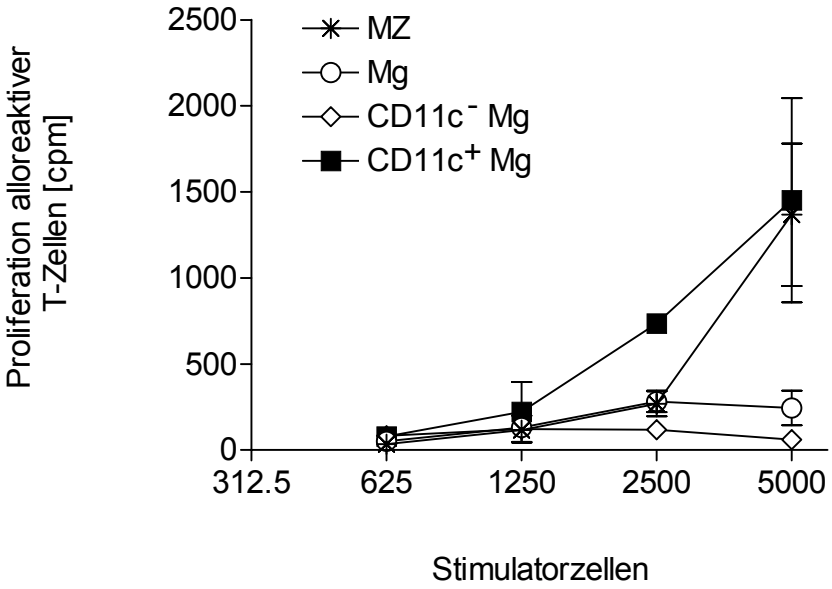


Abb. 3. Allostimulatorische Aktivität GM-CSF-abhängig differenzierter Mikrogliazellen

Aus BALB/c Mikroglia, die in Primärkultur unter dem Einfluss von GM-CSF gewachsen war (Mg), wurden $CD11c^+$ und $CD11c^-$ Zellen isoliert und 24 h in Gegenwart von GM-CSF mit sCD40L und einem kreuzvernetzendem Ak zur Ausreifung gebracht. Zur Kontrolle wurde unseparierte Mikroglia in gleicher Weise behandelt. Anschließend wurden die Mikrogliazellen in einer MLR als Stimulatorzellen gegen C57BL/6 T-Lymphozyten vergleichend mit Milz-DC (MZ) getestet. Alle Stimulatorzellen titriert von 312.5-5000 wurden mit 1.2×10^5 T-Zellen inkubiert. Die T-Zellproliferation wurde über die Inkorporation von ^{3}H-Thymidin während der letzten 24 h der 5 tägigen Inkubationszeit gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von jeweils drei parallelen Testkulturen. Die Hintergrundproliferation der Stimulatorzellen oder T-Zellen alleine betrug < 100 cpm.

LPS ist ein mikrobieller Stimulus der DC-Reifung in vitro und in vivo (Granucci et al., 1999, Winzler et al., 1997, De Smedt et al., 1996, Roake et al., 1995). Dieser wurde alternativ zu sCD40L als Reifungssignal an $CD11c^+$ Mikrogliazellen getestet. Es wurden Mikrogliazellen aus mit GM-CSF behandelter Primärkultur geerntet und die $CD11c^+$ Zellen mittels MACS isoliert. Diese wurden in der 24 h Sekundärkultur unbehandelt gelassen bzw. mit LPS oder sCD40L und kreuzvernetzendem Ak inkubiert. Mit sCD40L aktivierte $CD11c^+$ Mikrogliazellen waren in der Lage, eine maximale T-Zellproliferation im Vergleich zu Milz-DC zu induzieren (Abb. 4). Durch Behandlung mit dem mikrobiellen Stimulus LPS wurde eine geringere Ausreifung erzielt. Nur in GM-CSF gehaltene, nicht weiter stimulierte Zellen waren wenig effiziente Stimulatorzellen.

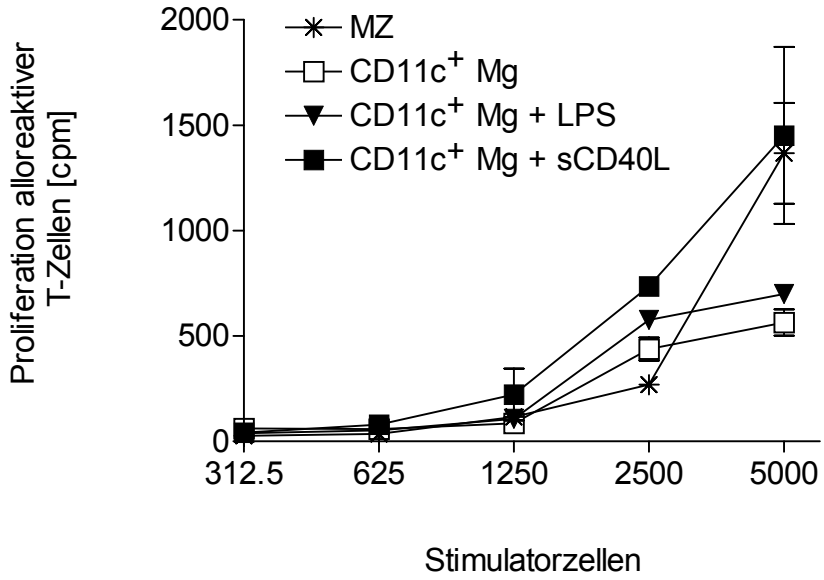


Abb. 4. Allostimulatorische Aktivität unterschiedlich ausgereifter CD11c-positiver Mikrogliazellen

Aus BALB/c Mikroglia, die in Primärkultur unter dem Einfluss von GM-CSF gewachsen war, wurden $CD11c^+$ Zellen isoliert und 24 h in Gegenwart von GM-CSF mit löslichem CD40-Ligand (sCD40L) und einem kreuzvernetzendem Ak oder mit LPS inkubiert bzw. unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Mikrogliazellen in einer MLR als Stimulatorzellen gegen C57BL/6 T-Lymphozyten vergleichend mit Milz-DC (MZ) getestet. Alle Stimulatorzellen titriert von 312.5-5000 wurden mit 1.2×10^5 T-Zellen inkubiert. Die T-Zellproliferation wurde über die Inkorporation von ^{3}H-Thymidin während der letzten 24 h der 5 tägigen Inkubationszeit gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SD von jeweils drei parallelen Testkulturen. Die Hintergrundproliferation der Stimulatorzellen oder T-Zellen alleine betrug < 100 cpm.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Differenzierung hirnständiger Vorläuferzellen zu reifen DC in zwei Stufen verläuft: Zuerst entwickeln sich GM-CSF abhängig unreife DC, deren funktionelle Reifung durch CD40-Ligation oder Kontakt mit LPS stimuliert wird. Damit ist das Potential des Gehirns aufgezeigt, eigene DC zu generieren. Diese Entwicklungsschritte entsprechen dem Konzept von Banchereau und Steinman, 1998.

3.3 Expression von CD83 in Hirnzellen

3.3.1 Etablierung einer RT-PCR für den Nachweis von CD83

CD83 ist ein Glykoprotein, das auf der Oberfläche humaner DC exprimiert wird und einen Marker für reife DC darstellt (Kruse et al., 2000). Die Expression von CD83 wird auf Transkriptionsebene reguliert. Die Maus-CD83 cDNA aus murinen Knochenmarks-DC konnte kürzlich kloniert werden (Berchtold et al., 1999).
Anhand der Kenntnis der Sequenz der CD83 cDNA sollte untersucht werden, ob die Expression von CD83 in vitro von GM-CSF abhängt und welche Zellen im normalen und enzephalitischen Gehirn diesen Marker exprimieren. Zum Nachweis von CD83 Transkripten in der Maus wurde eine RT-PCR etabliert und an cDNA aus Milz-DC getestet. Aus der kodierenden Sequenz (Abb. 5A) wurden zwei spezifische Primer für CD83 (2.1.11) ausgewählt. MZ wurden aus BALB/c Mäusen präpariert und $CD11c^+$ Zellen mittels MACS isoliert. Aus diesen wurde Gesamt-RNA extrahiert und in cDNA revers transkribiert. Die anschließende PCR (30 Zyklen) ergab ein Amplifikat der erwarteten Größe von 418 bp (Abb. 5B) für das CD83 Transkript der MZ. Zur Überprüfung der Sequenz wurde das Amplifikat isoliert, in den p-GEM-T-Vektor kloniert, und als gereinigte Plasmid-DNA isoliert. Die Sequenzanalyse entsprach der postulierten Partialsequenz von CD83. Die Spezifität der RT-PCR war somit gezeigt.

A

```
   1   atgtcgc**aaggcctccagctcctgtttctagg**ctgcgcctgcagcctggc   050
  51   acccgcgatggcgatgcgggaggtgacggtggcttgctccgagaccgccg   100
 101   acttgccttgcacagcgccctgggacccgcagctctcctatgcagtgtcc   150
 151   tgggccaaggtctccgagagtggcactgagagtgtggagctcccggagag   200
 201   caagcaaaacagctccttcgaggcccccaggagaagggcctattccctga   250
 251   cgatccaaaacactaccatctgcagctcgggcacctacaggtgtgccctg   300
 301   caggagctcggagggcagcgcaacttgagcggcaccgtggttctgaaggt   350
 351   gacaggatgccccaaggaagctacagagtcaactttcaggaagtacagg**g**   400
 401   **cagaagctgtgttgctcttctctctg**gttgttttctacctgacactcatc   450
 451   attttcacctgcaaatttgcacgactacaaagcattttcccagatatttc   500
 501   taaacctggtacggaacaagcttttcttccagtcacctccccaagcaaac   550
 551   atttggggccagtgacccttcctaagacagaaacggtatga           591
```

B

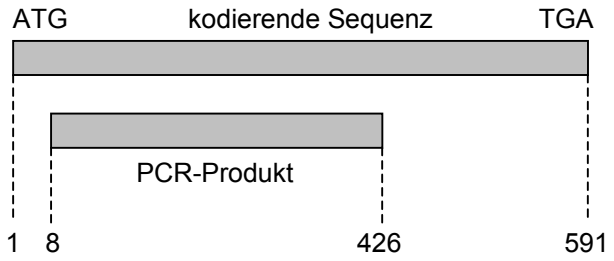


Abb. 5. CD83 kodierende Sequenz und RT-PCR von MZ

(A) Nukleotidsequenz der murinen CD83 cDNA. Die verwendeten CD83-spezifischen Primersequenzen sind fett gedruckt.
(B) Relative Position und Größe des PCR-Produkts.

Um zu prüfen, ob CD83 auch in Hirnzellen exprimiert wird, wurde aus Hirnzell-Primärkulturen gewonnene mRNA revers transkribiert. In der PCR wurden die mRNA von Hirnzellkulturen und Milz-DC vergleichend auf ihre CD83 Expression analysiert. Als Negativkontrolle wurde mRNA von T-Zellen ebenfalls auf die Expression dieses Markers untersucht. Abb. 6 zeigt, dass T-Zellen keine CD83 Transkripte aufweisen. Dagegen waren CD83-Transkripte in Milz-DC ebenso wie in kultivierten Hirnzellen deutlich nachweisbar. Zur Kontrolle der Qualität der RNA-Proben wurden parallel Transkripte für G3PDH nachgewiesen.

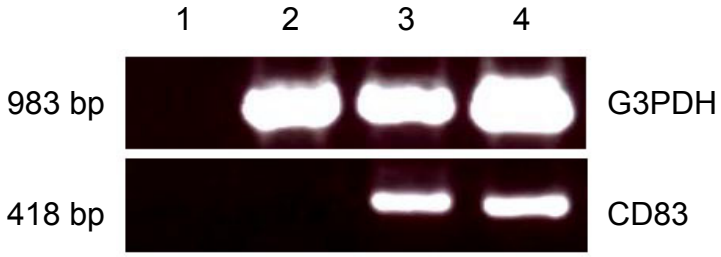


Abb. 6. Nachweis von CD83-Transkripten in Maus-Hirnzellen und Milz-DC

Mittels RT-PCR (30 Zyklen) wurden Milz-DC (3) und Gliazellen (4) aus Hirnzellkulturen von (B6x129)F2 Mäusen auf eine Expression von CD83 hin untersucht. Als Negativkontrolle wurden D10.G4.1 T-Zellen (2) getestet, die H_2O-Kontrolle ist in (1) dargestellt. Zur Qualitätskontrolle der RNA-Präparationen wurden parallel Transkripte für G3PDH nachgewiesen.

3.3.2 Wirkung von GM-CSF auf die Expression von CD83 in Gliazellen

GM-CSF gilt in vitro als Stimulus für die Entwicklung unreifer DC aus Mikroglia. Daher wurde die Expression von CD83 in unbehandelten oder mit GM-CSF behandelten Hirnzellen und Mikrogliazellen quantitativ verglichen. Dafür stehen uns GM-CSF defiziente ($GM\text{-}CSF^{-/-}$) Mäuse zur Verfügung. Hirnzell-Primärkulturen wurden nach der Konfluenz mit GM-CSF behandelt oder unbehandelt gelassen. Mittels RT-PCR wurden Transkripte für CD83 in beiden Zellpopulationen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Für einen quantitativen Vergleich wurde die Kopienzahl in beiden Ansätzen mittels 'real-time' PCR ermittelt. Als Standard wurde CD83 Plasmid-DNA titriert. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Kopienzahl in mit GM-CSF behandelten Kulturen gegenüber den unbehandelten Zellen (Abb. 7A). Unter dem Einfluss von GM-CSF kam es zu einer Erhöhung von 125 auf 375 Kopien/ng RNA, also eine Steigerung um den Faktor 3. Das zeigt, dass GM-CSF in Hirnzellen eine Steigerung der CD83 Expression bewirkt.

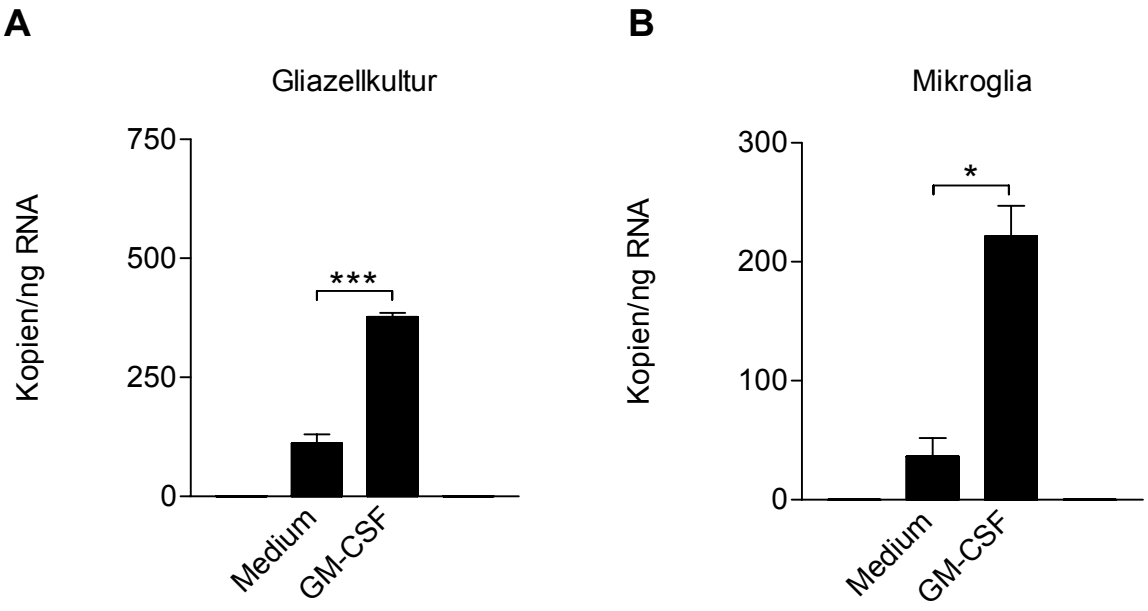


Abb. 7. Expression von CD83 in Hirnzellen und Mikroglia

(A) Am Ende einer zweiwöchigen Primärkultur wurden Hirnzellen aus GM-CSF-defizienten Mäusen für 4 Tage in Gegenwart von GM-CSF inkubiert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden mRNA-Transkripte für CD83 mittels 'real-time' PCR vergleichend quantifiziert.
(B) Aus wie in A behandelten Primärkulturen von C57BL6 Mäusen wurden Mikrogliazellen isoliert. Die daraus gewonnene RNA wurde vergleichend in der 'real-time' PCR gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SD aus Dreifachansätzen. $^{*}p<0.05$, $^{***}p<0.001$.

Um zu bestimmen in welchen Hirnzellen in der Primärkultur die Expression von CD83 durch GM-CSF induziert wird, wurden aus mit GM-CSF supplementierten bzw. unbehandelten Wildtypkulturen Mikrogliazellen isoliert und mittels der 'real-time' PCR für CD83 vergleichend analysiert. In Mikrogliazellen kam es durch die Behandlung mit GM-CSF zu einer signifikanten Steigerung der CD83 Expression (Abb. 7B). Die Kopienzahl erhöhte sich von ca. 30 Kopien/ng RNA aus unbehandelten Kulturen auf über 200 Kopien/ng RNA in mit GM-CSF supplementierten Kulturen. Damit wurde eine GM-CSF-abhängige Expression von CD83 in Hirnzellen, insbesondere in der Mikroglia nachgewiesen.

3.3.3 Induktion der CD83-Expression im Hirn bei Toxoplasmose

Vorbefunde unseres Labors zeigen, dass bei chronisch latenter Toxoplasmose mit Beginn der Enzephalitis DC im Hirn funktionell reifen (Fischer & Reichmann, 2001). Um zu prüfen, ob parallel dazu im Gehirn infizierter Tiere die CD83 Expression induziert wird und welche Zellen CD83 exprimieren, wurden mononukleäre Zellen aus dem Gehirn adulter BALB/c Mäuse während der chronischen Phase der Infektion analysiert. Außerdem wurden aus dem infizierten Gehirn $CD11c^+$ und $CD11c^-$ Zellen isoliert und vergleichend analysiert. Alternativ wurden mononukleäre Hirnzellen und Milz-DC aus uninfizierten Kontrolltieren untersucht. RNA aus allen fünf Zellpopulationen wurde mittels RT-PCR auf Transkripte für CD83 untersucht. Abb. 8A zeigt, dass mononukleäre Zellen aus dem normalen uninfizierten Hirn CD83 nicht exprimieren, während in Zellen aus dem infizierten entzündlichen Hirn CD83-Transkripte in deutlicher Menge nachweisbar waren. Aus dieser Hirnzellpopulation isolierte DC lieferten ein relativ stärkeres Signal, wohingegen $CD11c^-$ Zellen ein schwaches Signal zeigten. Es ist damit gezeigt, dass CD83 im enzephalitischen Gehirn, insbesondere von den $CD11c^+$ Hirn-DC exprimiert wird.

Um die Ergebnisse des CD83-Nachweises in Hirnzellen zu quantifizieren, wurde mit den Proben eine 'real-time' PCR durchgeführt. Als Standard wurde CD83 Plasmid-DNA titriert. RNA aus Milz-DC diente als Positivkontrolle, hier wurden 120 Kopien des CD83 Transkripts nachgewiesen (Abb. 8B). In mononukleären Hirnzellen aus uninfizierten Mäusen war kein CD83 nachweisbar. Nach 14-tägiger Infektion mit Toxoplasmen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Kopienzahl für das CD83-Transkript mit ca. 3000 Kopien/ng RNA. Die getrennte Analyse CD11c-positiver und CD11c-negativer Hirnzellen zu diesem Zeitpunkt der Infektion ergab, dass ausschließlich $CD11c^+$ Zellen CD83 mit einer Kopienzahl von fast 8000 Kopien/ng RNA exprimieren. Damit ist gezeigt, dass an Tag 14 nach der Infektion CD83 in Hirnzellen hochreguliert wurde, insbesondere in CD11c-positiven Zellen.

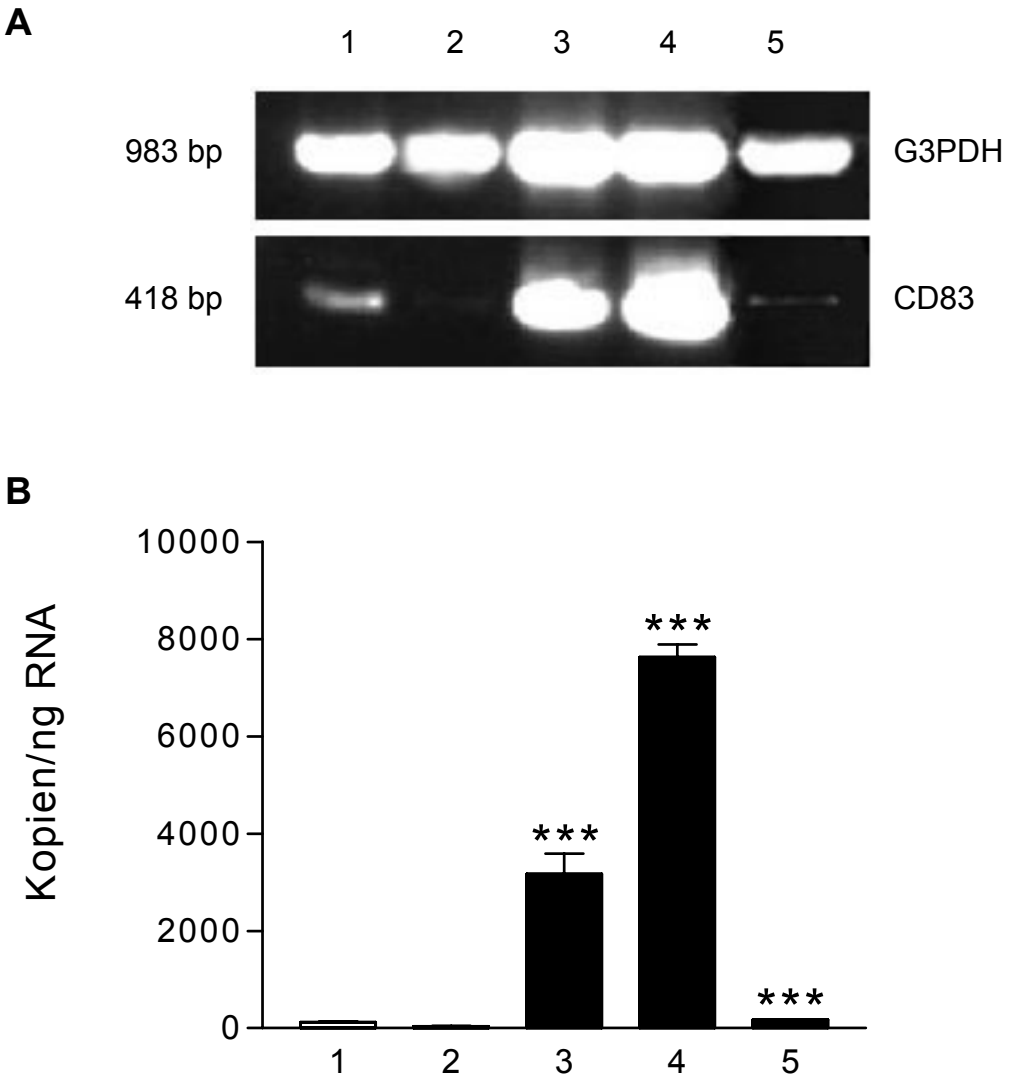


Abb. 8. Expression von CD83 in mononukleären Hirnzellen und Milz-DC

(A) In $CD11c^+$ MZ (1) und mononukleären Hirnzellen aus adulten, naiven (2) BALB/c Mäusen oder aus mit *Toxoplasma*-infizierten Tieren (3) bzw. daraus isolierte $CD11c^+$ (4) oder $CD11c^-$ (5) Zellen wurde die Expression von CD83 vergleichend mittels RT-PCR untersucht. Zur Kontrolle der Qualität der RNA-Proben wurden parallel Transkripte für G3PDH nachgewiesen.
(B) Um die Ergebnisse des CD83-Nachweises zu quantifizieren, wurde mit den Proben eine 'real-time' PCR durchgeführt. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SD aus drei Mäusen pro Infektionszeitpunkt. $^{***}p < 0.001$ im Vergleich zu uninfizierten Zellen.

In einem weiteren Experiment wurde die Kinetik der intrazerebralen CD83 Expression bei einsetzender Enzephalitis untersucht.
Der zeitliche Verlauf des Erscheinens CD83 exprimierender Zellen im enzephalitischen ZNS wurde an mononukleären Hirnzellen quantitativ verfolgt. Dazu wurden aus BALB/c Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* (Tag 0, 7, 10, 14 und 21) mononukleäre Hirnzellen isoliert und dann RNA extrahiert. Diese wurde zum einen mittels RT-PCR (Abb. 9A) auf das Vorhandensein von CD83-Transkripten analysiert und parallel dazu die Zahl der CD83-Transkripte pro ng Gesamt-RNA mittels 'real-time' PCR quantifiziert (Abb. 9B). In mononukleären Hirnzellen aus uninfizierten Mäusen waren keine Transkripte für CD83 nachweisbar. Sehr früh nach Infektion (Tag 7 und 10) war in dieser Zellpopulation die Expression von CD83 deutlich erhöht. Das entspricht der Zeit, zu der der Erreger erstmalig im Hirn nachweisbar ist (Dubey, 1997). Mit Beginn der histologisch sichtbaren Enzephalitis (Tag 14) stieg die CD83-Expression in Hirnzellen auf über 5000 Kopien/ng RNA. An Tag 21 war eine relative Abnahme der CD83 Expression in mononukleären Hirnzellen zu beobachten. Dies ist dadurch zu erklären, dass zwischen Woche zwei und drei nach Infektion die Zahl der ins Hirn einwandernden Lymphozyten massiv ansteigt und damit der Anteil der DC innerhalb der aus dem Hirn isolierten mononukleären Zellen abnimmt. Diese Befunde zeigen, dass schon früh im Verlauf einer TE reife $CD11c^+/CD83^+$ DC im Gehirn erscheinen und die Expression von CD83 an Tag 14, zeitgleich mit dem Erscheinen des Erregers im Gehirn, maximal ist.

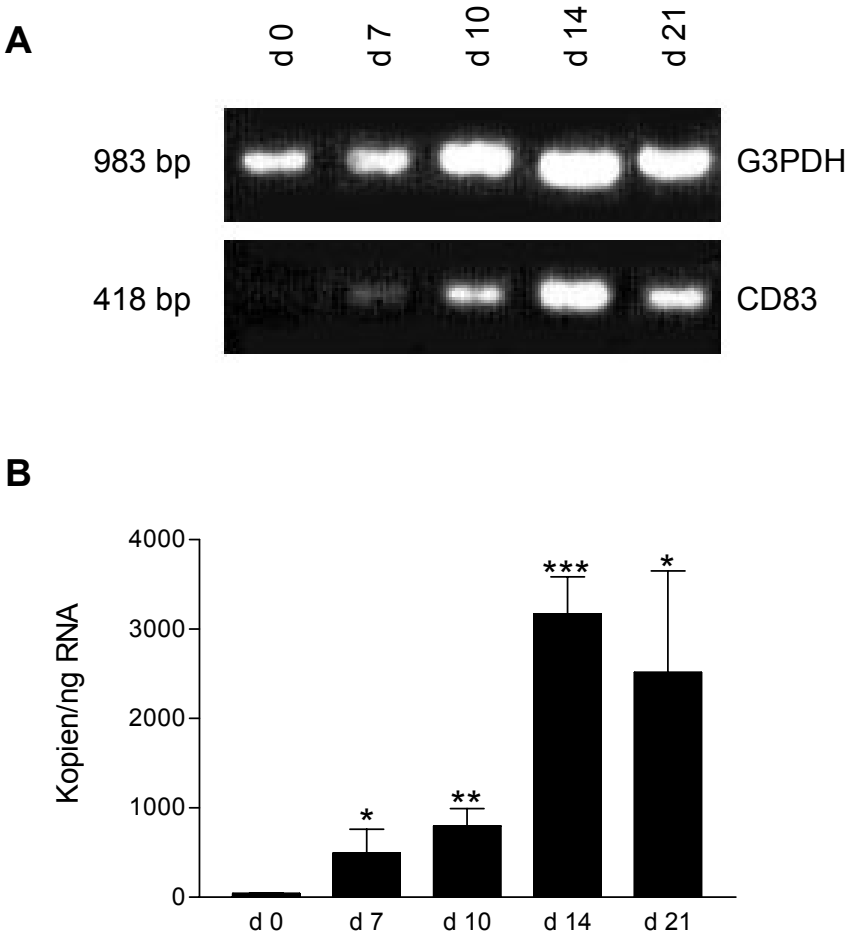


Abb. 9. Kinetik der Expression von CD83 im ZNS bei einsetzender Enzephalitis

(A) In mononukleären Zellen aus dem adulten Maushirn wurde mittels PCR unter limitierenden Bedingungen (30 Zyklen) Transkripte für CD83 nachgewiesen. Die Hirnzellen waren aus *Toxoplasma*-infizierten BALB/c Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (d 7 bis d 21) bzw. aus nicht infizierten Kontrolltieren (d 0) präpariert worden. Zur Kontrolle der Qualität der RNA-Proben wurden parallel Transkripte für G3PDH nachgewiesen.
(B) Zur quantitativen Analyse wurden die Proben anschließend mittels 'real-time' PCR analysiert. Angegeben sind Mittelwerte ± SD von je 3 Tieren/Gruppe. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ im Vergleich zu nicht infizierten Tieren.

3.4 GM-CSF induziert in Mikrogliazellen eine antiparasitäre Aktivität

Bei der Kultivierung von Hirnzell-Primärkulturen wurde beobachtet, dass sich in Hirnzell-Primärkulturen aus GM-CSF defizienten Mäusen im Gegensatz zu Wildtypkulturen kaum Mikrogliazellen mit der typischen Morphologie unreifer DC entwickeln (Abb. 10). Diese Bilder deuten an, dass endogenes GM-CSF für eine Entwicklung von Mikrogliazellen und anschließender Differenzierung zu unreifen DC notwendig ist.

w.t. GM-CSF$^{-/-}$

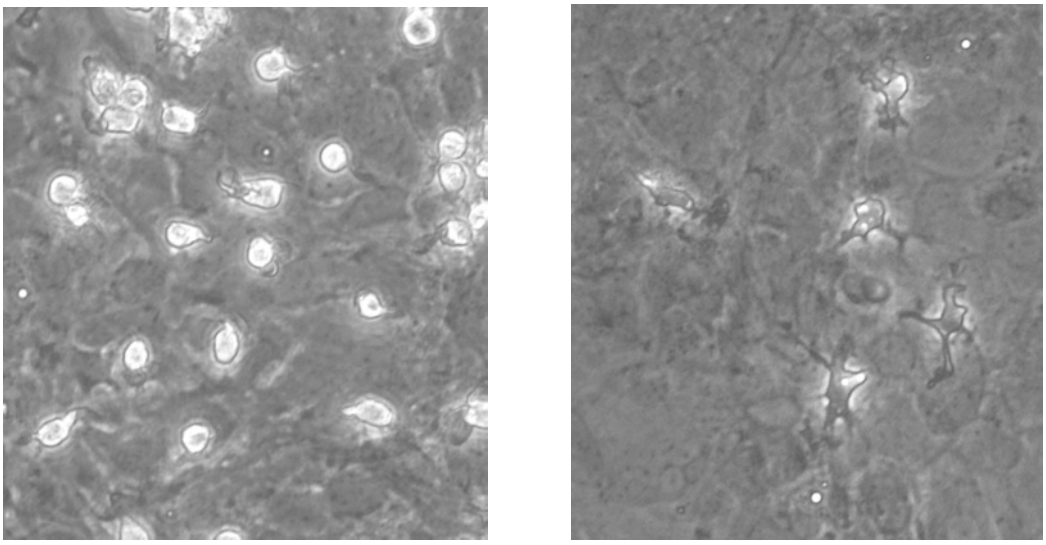


Abb. 10. GM-CSF-abhängige Entwicklung dendritischer Morphologie in vitro

Nach zweiwöchiger Primärkultur ohne Zugabe exogener Zytokine wurden Hirnzell-Primärkulturen (w.t.) aus Wildtyp-Mäusen und GM-CSF-defizienten Mäusen (GM-CSF$^{-/-}$) fotografiert. Phasenkontrast, 30-fach vergrößert.

Die Unfähigkeit, GM-CSF zu produzieren wurde kontrolliert. Hierzu wurden Hirnzellkulturen aus Wildtyp-Mäusen mit LPS stimuliert und Kulturen aus GM-CSF-defizienten Mäusen mit LPS stimuliert bzw. unbehandelt gelassen. Aus den Hirnzellen wurde RNA extrahiert und cDNA revers transkribiert. Mittels RT-PCR war ausschließlich in den Wildtypkulturen, die mit LPS stimuliert wurden GM-CSF nachweisbar. In Kulturen GM-CSF-defizienter Mäuse konnte kein GM-CSF nachgewiesen werden. Das Ergebnis wurde mittels Southern Blot bestätigt (Abb. 11).

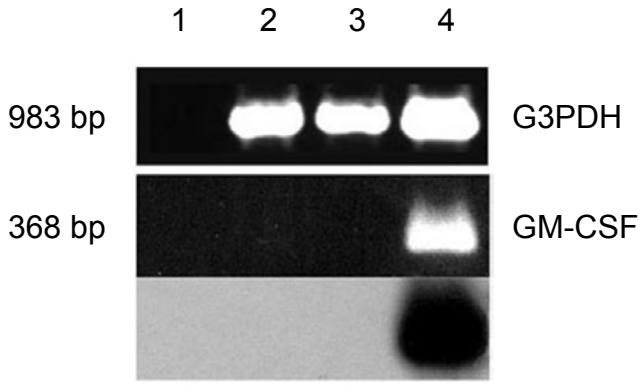


Abb. 11. Kontrolle der Expression von GM-CSF in Hirnzellen aus GM-CSF-defizienten und Wildtyp-Mäusen

Mittels RT-PCR wurden Zellen aus GM-CSF-defizienten Hirnzellkulturen ohne Stimulus (2) oder nach Stimulation mit 1 µg/ml LPS (3) oder Wildtypzellen aus mit LPS stimulierten Kulturen (4) auf Expression von GM-CSF hin untersucht. Die H_2O-Kontrolle ist in (1) dargestellt. Das Ergebnis wurde mittels Southern Blot bestätigt. Zur Kontrolle der Qualität der RNA-Proben wurden parallel Transkripte für G3PDH nachgewiesen.

Ausgehend von der Beobachtung, dass eine Infektion von Hirnzell-Primärkulturen aus GM-CSF-defizienten Mäusen mit Toxoplasmen ein scheinbar ungehemmtes Parasitenwachstum im Vergleich zu Parallelkulturen aus Wildtyp-Kontrollmäusen zur Folge hatte, wurden neonatale Hirnzellkulturen beider Mausstämme nach zweiwöchiger Primärkultur ohne Zusatz von exogenen Zytokinen im Verhältnis 3:1 mit *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten infiziert. Die Kulturen wurden nach weiteren 48 h fotografiert (Abb. 12). In den GM-CSF-defizienten Kulturen ist eine weitaus fortgeschrittenere Zelllyse zu beobachten, als in den Wildtyp-Kontrollkulturen.

w.t. GM-CSF$^{-/-}$

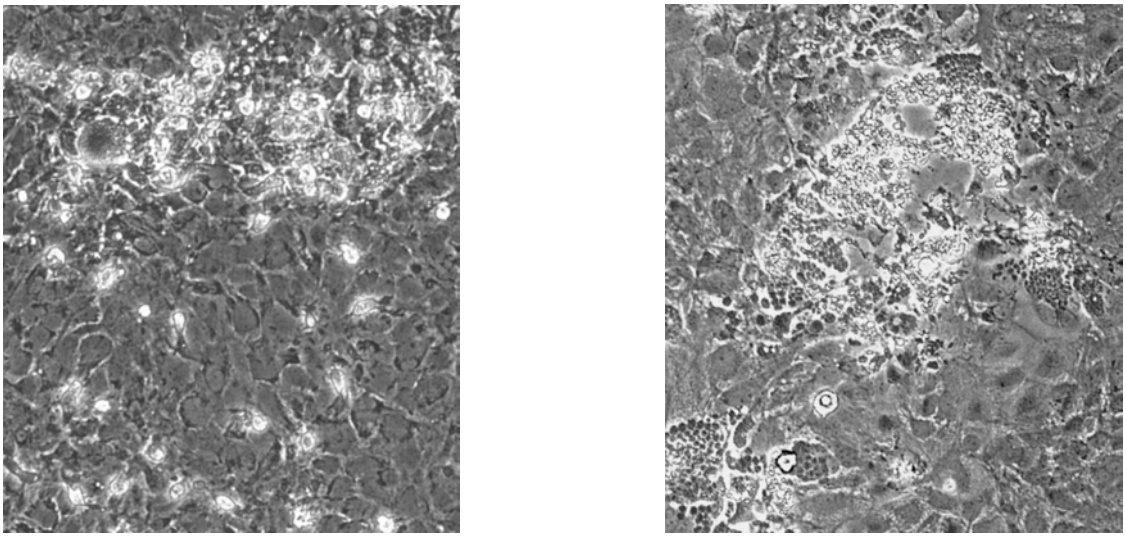


Abb. 12. Anti-parasitärer Effekt von GM-CSF in Hirnzellkulturen

Am Ende einer zweiwöchigen Primärkultur wurden Hirnzellen aus GM-CSF-defizienten Mäusen (GM-CSF$^{-/-}$) und (B6x129)F2 Wildtyp-Kontrolltieren (w.t.) mit Toxoplasmen im Verhältnis 3:1 infiziert. Nach 48 h wurden die Kulturen fotografiert. Phasenkontrast, 20-fach vergrößert.

Um zu prüfen, inwieweit endogenes GM-CSF eine antiparasitäre Effektorfunktion ausübt, wurde das intrazelluläre Toxoplasmenwachstum von Zellen aus Wildtypkulturen und GM-CSF-defizienten Kulturen vergleichend gemessen. Um den Effekt von exogenem GM-CSF zu überprüfen, wurden die Kulturen mit GM-CSF substituiert.

Konfluente Hirnzell-Primärkulturen aus GM-CSF-defizienten und Wildtyp-Kontrollmäusen wurden vier Tage mit GM-CSF behandelt oder blieben unbehandelt. Ein Teil der Kulturen wurde dann mit Toxoplasmen infiziert, Kontrollen blieben uninfiziert. Zwei Tage später wurde in den infizierten Hirnzellkulturen

lichtmikroskopisch eine intrazelluläre Vermehrung der Toxoplasmen und partiell eine Lyse von Wirtszellen beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt wurden alle Kulturen mit ^{3}H-Uracil für 24 h pulsmarkiert. Das Ergebnis der Szintillationsmessung (Abb. 13) bestätigte die frühere Beobachtung: Das intrazelluläre Parasitenwachstum in GM-CSF-defizienten Hirnzellen war deutlich stärker als das in den Kontrollzellen. Die mittlere Uracilinkorporation betrug in GM-CSF-defizienten Hirnzellen das 1.5fache des Referenzwertes aus Wildtypzellen. In beiden Zellpopulationen bewirkte exogen zugegebenes GM-CSF eine deutliche Reduktion der Toxoplasmenproliferation. Bei den Wildtypkulturen war ein Rückgang der Uracil-Inkorporation auf ca. die Hälfte und bei den GM-CSF-defizienten Kulturen um ca. zwei Drittel zu verzeichnen. Damit ist geprüft, dass erstens die endogene GM-CSF-Produktion einen antiparasitären Effekt nach sich zieht und zweitens durch Zugabe von exogenem GM-CSF die antiparasitäre Wirkung weiter gesteigert werden kann.

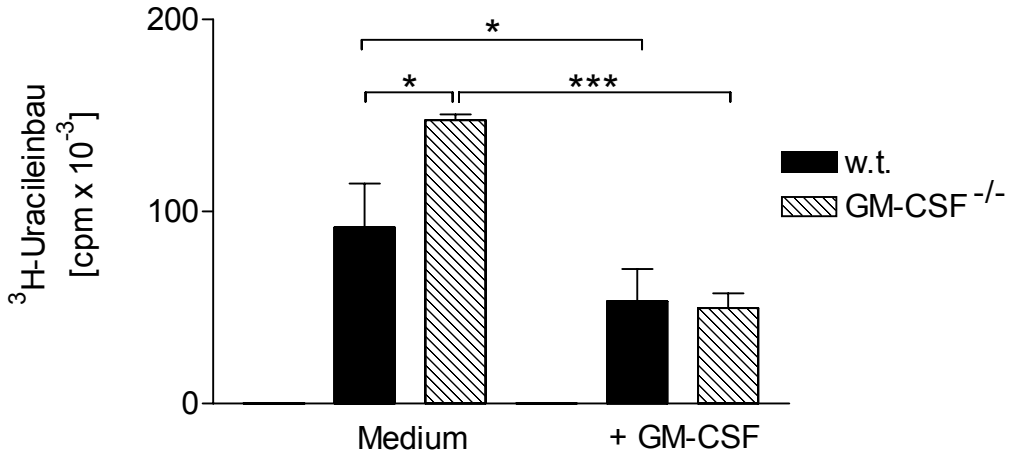


Abb. 13. GM-CSF-abhängige anti-parasitäre Aktivität von Gliazellen

Am Ende einer zweiwöchigen Primärkultur wurden Hirnzellen aus GM-CSF-defizienten Mäusen (GM-CSF$^{-/-}$) und (B6 x 129)F2 Wildtyp-Kontrolltieren (w.t.) 4 Tage in Gegenwart von GM-CSF inkubiert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit Toxoplasmen im Verhältnis 3:1 infiziert. Nach 48 h wurde die intrazelluläre Proliferation der Toxoplasmen über den Einbau von ^{3}H-Uracil gemessen. Der Uracileinbau in nicht infizierten Kontrollzellen ergab <1500 cpm. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus vierfachen Kulturansätzen. $^{*}p<0.05$, $^{***}p<0.001$.

In GM-CSF-defizienten Hirnzellkulturen war nach Infektion keine Entwicklung dendritischer Mikrogliazellen erkennbar, während solche Zellen sich in Wildtyp-Hirnzellkulturen nach einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* rasch entwickeln (Fischer et al., 2000). In zwei Wochen alten Hirnzellkulturen (Abb. 14), welche im Verhältnis 3:1 mit Toxoplasmen infiziert wurden, entwickelten sich in Wildtyp-Kulturen auf dem Gliazellrasen typische 'veiled cells'. Im Gegensatz dazu entwickelten sich in GM-CSF-defizienten Kulturen keine Zellen mit dendritischer Morphologie. Nach der Infektion mit *Toxoplasma gondii* entwickelten sich Zellen mit der typischen Morphologie unreifer DC nur in GM-CSF-haltigen Wildtypkulturen, demnach scheint GM-CSF für die Differenzierung von DC notwendig zu sein.

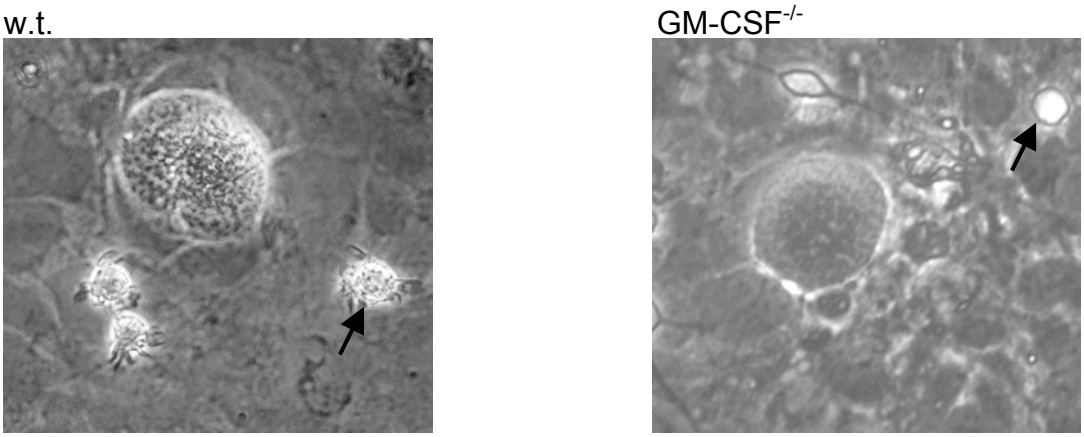


Abb. 14. Hirnzell-Primärkultur nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* Bradyzoiten

Nach zweiwöchiger Primärkultur ohne exogene Zytokine wurden Hirnzellen aus Wildtyp-Mäusen (w.t.) und GM-CSF-defizienten Tieren (GM-CSF$^{-/-}$) mit *Toxoplasma gondii* Bradyzoiten (Stamm DX) im Verhältnis 3:1 infiziert und nach 14 Tagen fotografiert. Phasenkontrast, 40-fach vergrößert.

Um direkt zu prüfen, ob unreife DC aus der Hirnzellpopulation die Hemmung der Toxoplasmenproliferation bewirken, wurden in Erweiterung des Experiments über den infizierten Hirnzellen in einem Transwell-Einsatz $CD11c^+$ Mikrogliazellen kokultiviert, die aus GM-CSF-vorbehandelten Parallelkulturen isoliert worden waren. Das Ergebnis (Abb. 15) zeigt, dass diese, in der T-Zellstimulation unreifen DC eine antiparasitäre Funktion ausüben. In Kulturen, die mit DC kokultiviert wurden konnte eine weiter reduzierende Wirkung des Toxoplasmenwachstums im Vergleich zu mit GM-CSF supplementierten Kulturen gegenüber unbehandelten Kulturen erzielt werden. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4-fach-Bestimmungen ± SD. Die durch DC bewirkte antiparasitäre Wirkung wird über einen löslichen Faktor(en) vermittelt.

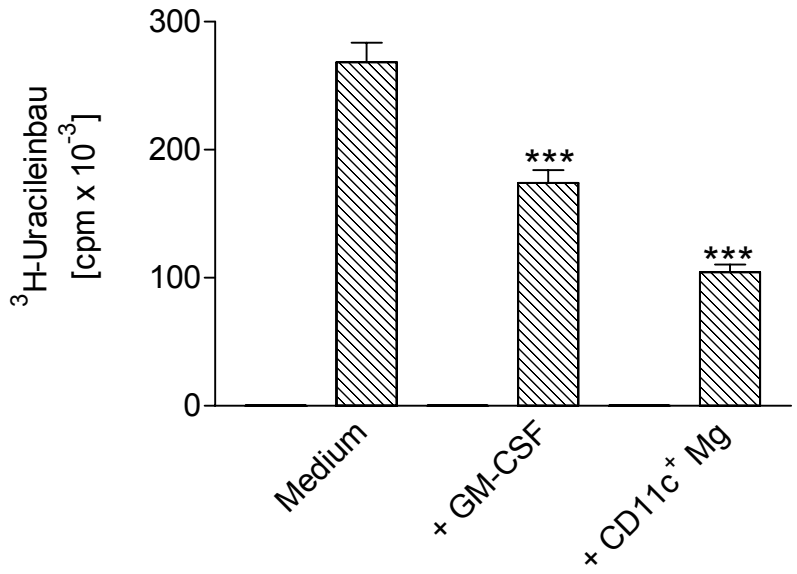


Abb. 15. Anti-parasitärer Effekt von GM-CSF und $CD11c^+$ Mikrogliazellen in Hirnzell-Primärkulturen

Am Ende einer zweiwöchigen Primärkultur wurden Hirnzellen aus GM-CSF-defizienten Mäusen 1:1 mit Toxoplasmen infiziert. In Parallelkulturen waren die Zellen 2 Tage mit GM-CSF vorbehandelt worden, unbehandelt gelassen oder es wurden zusammen mit den Toxoplasmen in gleicher Zahl $CD11c^+$ Mikrogliazellen (Mg) aus GM-CSF-supplementierter Vorkultur zugegeben. Nach 48 h wurde die intrazelluläre Proliferation der Toxoplasmen über den Einbau von ^{3}H-Uracil gemessen. Der Uracileinbau in nicht infizierten Kontrollzellen ergab <1500 cpm. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus vierfachen Kulturansätzen. $^{***}p<0.001$ im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen.

Die Daten zeigen, dass von Hirnzellen produziertes GM-CSF auch deren antimikrobielle Effektorfunktion steigert, da GM-CSF-defiziente Hirnzellen im Vergleich zu Zellen aus Wildtypmäusen für eine Toxoplasmeninfektion wehrlos sind, das Parasitenwachstum nach Substitution mit exogenem GM-CSF jedoch hemmen. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die von Hirn-DC produzierten löslichen Faktoren.

4. Diskussion

4.1 DC im Zentralnervensystem

Antigenpräsentierende Zellen sind essentiell für die Induktion einer T-Zellantwort. Die bislang im ZNS nachgewiesenen APC benötigen für eine effektive Antigenpräsentationsleistung die Voraktivierung mit IFNγ. Als von IFNγ-unabhängige APC sind DC effiziente Stimulatoren von B- und T-Lymphozyten. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion adaptiver Immunität.

Wie wird eine T-Zellantwort im Gehirn induziert? Trotz seines Immunprivilegs ist das ZNS empfänglich für entzündliche Erkrankungen. Bei Entzündungen wandern neben in der Peripherie voraktivierten T-Zellen auch naive T-Zellen ins Parenchym ein (Krakowski & Owens, 2000) und treffen hier auf lokale APC. Potentielle APC im ZNS, sind perivaskuläre Zellen sowie Astrozyten und Mikrogliazellen (Sedgwick & Hickey, 1997; Aloisi et al., 2000a). Außerdem wurden DC bei infektiöser Enzephalitis im Hirnparenchym lokalisiert und anhand DC-spezifischer Marker und Funktionen identifiziert (Suter et al., 2000; Fischer et al., 2000). Bei der TE ergaben funktionelle Analysen, dass DC fähig sind T-Zellen zu stimulieren (Fischer et al., 2000; Fischer & Reichmann, 2001). Dagegen wurde bei der EAE kürzlich eine Hemmung der T-Zellaktivierung nachgewiesen (Suter et al., 2003). Es zeigt sich somit, dass bei zerebralen Infektionskrankheiten je nach Pathogen und Muster der Zytokinsekretion sowohl eine Aktivierung als auch eine Hemmung von T-Zellen stattfinden kann.

Im gesunden Hirnparenchym sind DC nicht nachweisbar. Außerhalb der Blut-Hirn-Schranke wurden MHC Klasse II^+ DC-artige Zellen in der Dura mater, in den Meningen und im Plexus Choroideus identifiziert (Mc Menamin, 1999; Serot et al., 1997; Matyszak et al., 1992). Bei einer Entzündung sind DC im Rückenmark und im Hirnparenchym vorhanden. In der Maus wurden DC bei TE (Fischer et al., 2000) und EAE nachgewiesen (Serafini et al., 2000; Suter et al., 2000; Fischer & Reichmann, 2001). Intrazerebrale DC wurden in der Ratte bei einer lokalen Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ nach Einbringen von Bacillus Calmette-Guerin-Erregern in das Hirnparenchym nachgewiesen (Matyszak & Perry, 1996). Kürzlich wurde gezeigt, dass auch beim Menschen während einer bakterieller Meningitis oder bei einer Lyme-Meningoenzephalitis DC in der Zerebrospinalflüssigkeit vorhanden

sind (Pashenkov et al., 2002). Für die murine TE und EAE wurde gezeigt, dass es sich bei den Hirn-DC um myeloide DC handelt (Fischer et al., 2000).

Der Ursprung der DC im entzündlich veränderten ZNS ist bis heute noch nicht geklärt. Es ist möglich, dass DC aus dem Blut oder den Meningen in entzündliche Areale des ZNS rekrutiert werden (Robert et al., 1999). Alternativ könnten sich DC aus Monozyten differenzieren, die ins inflammatorische Gehirn einwandern (Schreurs et al., 1999). Hinweise aus in vitro Experimenten deuten auf eine dritte Möglichkeit, die Differenzierung von DC aus parenchymatischen, wahrscheinlich Mikroglia-artigen Vorläuferzellen hin. Es wurde gezeigt, dass sowohl das embryonale als auch das adulte Gehirn $CD11b^+$ myeloide Vorläuferzellen enthält (Alliot et al., 1991). Außerdem entwickeln sich unreife DC in mit GM-CSF supplementierter Primärkultur (Fischer & Bielinsky, 1999; Fischer et al., 1993a). Diese Befunde, die für eine Differenzierung von DC aus Mikroglia sprechen, werden durch die Generierung allostimulatorisch aktiver, $CD11c^+$ Zellen aus normaler, ruhender Mikroglia ex vivo unterstützt (Fischer & Reichmann, 2001). GM-CSF induziert die Expression des Markers CD11c, welche durch die Entwicklung von Zellen mit dendritischer Morphologie und T-zellstimulatorischer Aktivität in der MLR begleitet wurde.

Es gibt Hinweise darauf, dass sich ein Teil der DC-Population im entzündlich veränderten ZNS aus lokalen Vorläuferzellen entwickelt (Alliot et al., 1991), während ein anderer Teil, von Chemokinen angelockt, in das Gehirn einwandert (Pashenkov et al., 2002). Diese Vermutung wird durch kürzlich durchgeführte Experimente unterstützt. In einem Modell der Enzephalitis wurde die Herkunft der Hirn-DC in Knochenmarkchimären untersucht. Im Hirn chronisch mit *Toxoplasma gondii* infizierter Mäuse wurden DC sowohl in Mikrogliazellen als auch in entzündlichen Infiltraten identifiziert (Fischer et al., Manuskript in Vorbereitung). Zunächst wurden Leukozyten ins ZNS rekrutiert, die Marker von DC aufwiesen und anschließend wurden DC-Marker auf Mikrogliazellen hochreguliert. Beide Populationen ähneln phänotypisch DC und expandieren mit dem Fortschreiten der Enzephalitis. Damit wurde gezeigt, dass in vivo zunächst hämatopoetische DC ins Gehirn einwandern, gefolgt von der endogenen Entwicklung von DC aus Mikroglia.

4.2 Mikroglia als Prä-DC?

Der Ursprung der Hirn-DC ist noch ungeklärt. Die Hypothese, dass sie sich während der Mikrogliose zu Beginn einer Enzephalitis aus Mikrogliazellen entwickeln, beruht auf dem Nachweis gemeinsamer Oberflächenmarker (Santambrogio et al., 2001) und der Generierung funktioneller DC aus ruhender Mikroglia ex vivo (Fischer & Bielinsky, 1999; Fischer et al., 2000).

Verschiedene Befunde sprechen für eine Entwicklung von DC aus Mikrogliazellen. GM-CSF ist ein Wachstums- und Differenzierungsfaktor von DC aus Knochenmarkzellen in vitro (Inaba et al., 1992). Außerdem wurde GM-CSF als Mikrogliawachstums- und Differenzierungsfaktor identifiziert (Giulian & Ingemann, 1988; Frei et al., 1987). Eine intrazerebrale Produktion von GM-CSF durch Gliazellen bzw. Astrozyten auf einen entzündlichen Reiz oder mikrobiellen Stimulus hin wurde nachgewiesen (Malipiero et al., 1990; Fischer et al., 1997). Außerdem kommt es während einer Enzephalitis sehr früh zur Produktion von GM-CSF (Hunter et al., 1992; Lyons et al., 1999). GM-CSF bewirkt eine Differenzierung von Mikroglia in aktive APC (Aloisi et al, 2000a). Somit existieren GM-CSF reaktive Zellen im Gehirn. In Knochenmarkprimärkulturen wurde unter dem Einfluss von GM-CSF ebenfalls ein Entstehen von DC beobachtet (Inaba et al., 1992). In Hirnzellkulturen aus neonatalem Maushirn entwickeln sich unter dem Einfluss von GM-CSF Zellen, die eine dendritische Morphologie aufweisen und phänotypisch und funktionell unreifen myeloiden DC gleichen (Fischer & Bielinsky, 1999). Mikroglia kann zu einem unreifen DC-ähnlichen oder Makrophagen-ähnlichen Phänotyp mittels GM-CSF oder M-CSF geprägt werden (Santambrogio et al., 2001). Die GM-CSF abhängige Entwicklung von DC geht mit einer Zellproliferation einher (Inaba et al., 1992). Dabei ist eine Population proliferierender Zellen zu Beginn der Entzündung im ZNS positiv für den DC-Marker CD11c (Fischer & Reichmann, 2001).

Da sich DC aus neonatalen Hirnzellen in vitro entwickeln, wenn die Zellkultur mit GM-CSF supplementiert oder mit Toxoplasmen infiziert wurde, stammen sie aus demselben Vorläuferzellpool wie GM-CSF-abhängig differenzierte Mikroglia. Mikroglia und unreife DC weisen einige Gemeinsamkeiten auf. Beide exprimieren den makrophagen-spezifischen Oberflächenmarker F4/80 sowie CD11b und c-fms (Tabelle 1), weisen also Äquivalente in ihrer Oberflächenmarkerexpression auf. Mikrogliazellen reagieren auf M-CSF und GM-CSF. Eine Differenzierung zu Makrophagen ist möglich und eine Differenzierung zu myeloiden DC wird vermutet. Sie sind nur zu einer schwachen T-Zell-Stimulation fähig und induzieren T-Zell-

Anergie. Ihre Hauptaufgabe ist die Phagozytose, des weiteren benötigen sie IFNγ um die Antigenpräsentationsfunktion ausüben zu können.

Unter dem Einfluss von GM-CSF entwickeln sich in Hirnzell-Primärkulturen aus neonatalem Maushirn Zellen, die eine dendritische Morphologie aufweisen und phänotypisch und funktionell unreifen myeloiden DC gleichen. Diese Zellen galten bislang als eine Form aktivierter Mikroglia. Sie exprimieren die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie CD83 nur schwach und sind wenig effektive Stimulatorzellen in der allo-MLR. Jedoch können sie gegenüber 'antigen-primed' T-Zellen (in vitro restimulierte T-Zelllinien oder T-Zellklone) IFNγ-unabhängig Antigen präsentieren.

Die unreife DC ist dadurch charakterisiert, dass sie mit GM-CSF und M-CSF proliferiert und eine Differenzierung regulatorischer T-Zellen induziert. Hauptaufgabe ist die Antigenaufnahme und Prozessierung, die MHC II Moleküle sind intrazellulär ausgebildet, damit ist die Fähigkeit zur Antigenpräsentation gering. Die Differenzierung erfolgt zum Makrophagen oder zur reifen DC. Hirnständige Mikroglia ist im Gegensatz zu anderen Gewebs-APC nicht terminal entlang der myeloiden Zelllinie differenziert.

Tabelle 1:
Merkmale ruhender Mikroglia, unreifer und reifer myeloider DC in der Maus

Mikroglia	unreife DC	reife DC
Phänotyp. Marker CD11b, F4/80, c-fms, c-kit MHC II^- $CD40^-$, $CD80^-$, $CD86^{\pm}$ $CD83^-$	 CD11c, CD11b F4/80, c-fms, c-kit MHC II^+ (leer) $CD40^-$, $CD80^+$, $CD86^+$ $CD83^{\pm}$	 CD11c MHC II^+ $CD40^+$, $CD80^+$, $CD86^+$ $CD83^+$
Funktion Phagozytose, Induktion einer T-Zell-Anergie	 Phagozytose, Induktion regulatorischer T-Zellen	 Antigenpräsentation, T-Zellpriming
Differenzierung zu Makrophagen, zu DC	 zu reifen DC, zu Makrophagen	 Apoptose

Dass die $CD11c^+$ Mikrogliazellen das Potential haben, innerhalb von wenigen Stunden zu funktionell aktiven DC zu reifen, wurde anhand der MLR-Aktivität nach Ligation von CD40 gezeigt (3.2.2). Dieser Stimulus simuliert eine Interaktion mit T-Zellen, schließt dabei aber Effekte durch Sekretionsprodukte aktivierter T-Zellen (z.B. IFNγ) aus, die eine funktionelle Prägung der DC bewirken könnten (Vieira et al., 2000). Im T-Zellproliferationstest bewirkten schon 5×10^3 GM-CSF-differenzierte $CD11c^+$ Mikrogliazellen eine maximale Stimulation von 1.2×10^5 T-Zellen. Die Stimulation durch Milz-DC führte zu vergleichbaren Proliferationswerten. Auf inflammatorische, mikrobielle Signale reagieren DC mit einer Hochregulation von CD40 (Schulz et al., 2000). In der Interaktion mit T-Zellen regulieren sie dann zusätzlich CD80 und CD86 hoch und sind nun fähig, auch naiven T-Zellen Antigen zu präsentieren.

Bei der Differenzierung zur reifen DC werden MHC II Moleküle hochreguliert. Außerdem werden die kostimulatorischen Liganden für T-Zellen CD40, CD80, CD86 und die DC-Marker CD83 und CD11c hochreguliert (Banchereau & Steinman, 1998;

Aloisi et al., 2000a; Granucci et al., 1999; Ford et al., 1996) . Die Expression von 33D1 und das Fehlen von CD8α im Gehirn chronisch infizierter Mäuse lässt auf einen myeloiden Ursprung der DC schließen (Fischer et al., 2000). Die Funktion reifer DC ist die Antigenpräsentation für T-Zellen. Die Fähigkeit zur Phagozytose haben diese Zellen verloren. Zur Reifung benötigt die DC einen mikrobiellen Stimulus (Schulz et al., 2000) oder die Ligation mit CD40, welche in eine homogene Zellpopulation mit verstärkter Expression der Oberflächenmoleküle und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen resultiert (Würtzen et al., 2001).

Die DC kann eine funktionelle Prägung durch Signale aus ihrer Umgebung erfahren. Dendritische Zellen, welche unter dem Einfluss von Prostaglandin E_2 reifen, induzieren eine Th2 Immunantwort und DC, welche unter dem Einfluss von IFNγ reifen, prägen eine Th1 Antwort (Vieira et al., 2000).

4.3 Reifung intrazerebraler DC bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS

Humanes CD83 ist ein 45 kDa großes membranständiges Glykoprotein, welches zur Ig-Superfamilie gehört. Es ist ein spezifischer Oberflächenmarker reifer DC. CD83 wird nicht in unreifen DC, sondern nur in reifen DC exprimiert (Kruse et al., 2000). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass CD83 während der DC-Reifung, nach Stimulation mit LPS oder TNFα auf Transkriptionsebene hochreguliert wird (Berchtold et al., 1999). Die Expression ist auf Langerhans-Zellen in der Haut und in den T-Zellarealen lymphatischer Organe nachweisbar (Weissman et al., 1995; Zhou et al., 1992; Zhou & Tedder, 1995). Das Molekül besteht aus einer extrazellulären Ig-ähnlichen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer 39 Aminosäuren großen intrazellulären Domäne (Zhou et al., 1992; Kozlow et al., 1993). Das murine CD83-Gen kodiert für ein 175 Aminosäuren großes Transmembran-Glykoprotein mit einer extrazellulären Ig-ähnlichen Domäne und einer 39 Aminosäuren großen zytoplasmatischen Domäne.

Der Vergleich von humanem und murinem CD83 zeigt eine Übereinstimmung in der Aminosäurensequenz von 63% (Twist et al., 1998). Sowohl humane CD83 (Kozlow et al., 1993) als auch murine CD83 (Twist et al., 1998) mRNA wurde im Gehirn lokalisiert, jedoch nicht die Zellen, welche diesen Marker exprimieren. Die Funktion von CD83 ist noch nicht bekannt, seine selektive Expression und die Hochregulation der Expression, einhergehend mit der Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 (Berchtold et al., 1999; Banchereau & Steinman, 1998; Zhou &

Tedder, 1995), sprechen für eine Rolle in der Interaktion mit T-Zellen. Einen Hinweis dafür liefert, dass die Inhibierung der CD83 Expression zu einer Reduktion der T-Zellstimulation in vitro führt (Kruse et al., 2000). Die erste funktionelle Charakterisierung von CD83 zeigt, dass dieses Oberflächenmolekül möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Regulierung der durch DC vermittelten Immunantwort spielt.

Darüber hinaus ist die Funktion von humanem, löslichem CD83 als ein reversibler Inhibitor der durch DC vermittelten T-Zellstimulation wichtig, um die Biologie von DC auf molekularer Ebene zu untersuchen und gegebenenfalls neue therapeutische Strategien zu entwickeln (Lechmann et al., 2002). Dass CD83 für $CD4^+$ T-Zellgenerierung benötigt wird (Fujimoto et al., 2002), legt ebenfalls die Vermutung nahe, dass CD83 ein wichtiger Regulator für die Immunantwort in vitro und in vivo ist.

Mit CD83 wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein zellspezifischer Marker reifer DC an Hirnzellen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, das die Expression dieses Markers auf die Population CD11c-positiver Zellen innerhalb der aus dem Hirn isolierten mononukleären Zellen beschränkt ist. Damit werden Ergebnisse der bisherigen funktionellen Analysen an $CD11c^+$ Hirnzellen und ihre Identifikation als DC bestätigt. Im untersuchten Modell der Maus-Toxoplasmose zeigt die zeitliche Veränderung in der zellulären CD83 Expression eine Parallele zum Zeitverlauf der Infektion des ZNS: Die Kinetik impliziert ein sehr frühes Erscheinen CD83 exprimierender DC im Hirn, das bereits vor der Entwicklung einer histologisch sichtbaren Inflammation einsetzt und mit Beginn der Enzephalitis nochmals gesteigert wird. Reife DC erscheinen zu einem frühen Zeitpunkt im Gehirn. Das korreliert mit dem Erscheinen des Erregers im Maushirn, sechs Tage nach oraler Infektion mit *Toxoplasma gondii* (Dubey, 1997).

Die funktionelle Reifung von DC im ZNS (Fischer & Reichmann, 2001) setzt mit einer Verzögerung gegenüber der CD83 Expression ein, steigert sich zunehmend und auch nach der akuten Infektion sind noch funktionell reife DC im Gehirn nachweisbar. Es stellt sich die Frage, was für die Reifung dieser DC verantwortlich ist. Zum einen könnten CD40 Ligand exprimierende, aktivierte T-Zellen die DC zur Ausreifung stimulieren (Schulz et al., 2000; Stout & Suttles, 1996), zum anderen vom Parasiten gelieferte Stimuli (Reis e Sousa et al., 1997; Schulz et al, 2000). Auch ist noch nicht geklärt, wo die DC reifen. Generell sind zwei verschiedene Szenarien denkbar. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Zellen als unreife DC aus dem Blut rekrutiert werden und auf dem Weg in das Gehirn reifen. Dabei ist ein Kontakt mit GM-CSF

und dem Erreger möglich. Eine andere Möglichkeit besteht in der lokalen Reifung am inflammatorischen Herd. Die unreife DC reift durch sezernierte inflammatorische Zytokine und mikrobielle Stimuli zur reifen DC. So könnten auch aus Mikroglia unter dem Einfluss des entzündlichen Geschehens reife DC differenzieren, welche wiederum die T-Zellantwort induzieren.

Das aus unseren Befunden abgeleitete Konzept zur funktionellen Differenzierung von Hirn-DC ist im folgenden skizziert:

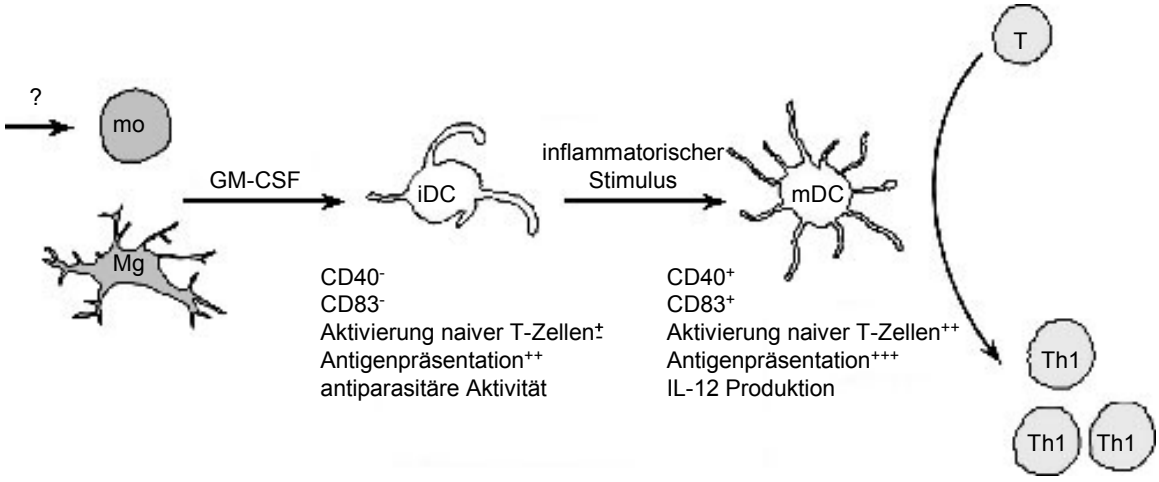


Abb. 16. Postulierte Stufen der intrazerebralen Entwicklung funktioneller DC

Unter dem Einfluss von GM-CSF aus dem entzündlichen Hirn 'microenvironment' differenzieren eingewanderte DC-Vorläufer (mo) und/oder residente Mikroglia (Mg) zu unreifen DC (iDC). Die iDC haben eine geringe Fähigkeit naive T-Zellen zu aktivieren, jedoch eine ausgeprägte Antigen-präsentationsfunktion gegenüber 'antigen-primed' T-Zellen und weisen außerdem antiparasitäre Aktivität auf. Ein Reifungssignal, z.B. mikrobielle Faktoren oder die Ligation von CD40 im Kontakt mit T-Zellen, induziert volle T-Zell stimulatorische Funktion. Im Hirn stimulieren derart gereifte DC (mDC) effektiv naive T-Zellen und primen sie nach Th1.

Das Schicksal der DC nach durchgemachter Infektion ist unklar. Eine denkbare Möglichkeit ist die lokale Apoptose. Eine andere Möglichkeit ist das Auswandern zu zervikalen Lymphknoten. Das wurde gezeigt für DC, die ins ZNS injiziert wurden (Carson et al., 1999).

4.4 Antimikrobielle Aktivität unreifer Hirn-DC

Die zerebrale Toxoplasmose liefert ein Modell, mit welchem sich Abwehrmechanismen des Immunsystems im Gehirns untersuchen lassen. Während der akuten Phase der Infektion infiziert der Erreger sowohl Neurone als auch Gliazellen. Nach der Ausbildung des Zystenstadiums und Elimination freier Tachyzoiten geht die Infektion in ihre chronisch-latente Phase über. Die Persistenz von *Toxoplasma gondii* im Gehirn verlangt ein intaktes Immunsystem. Bei einer Immunsuppression kommt es zur Reaktivierung der Infektion, die zum Tod des Wirts führen kann. Genetisch resistente Mausstämme wie z.B. BALB/c sind in der Lage, die Infektion zu kontrollieren (Suzuki et al., 1994). Hier sinken während der chronischen Phase die Parasitenlast und Zystenzahl. Die Enzephalitis verläuft mild.

T-Zellen und das von ihnen produzierte IFNγ spielen eine wichtige Rolle bei der Prävention einer TE, indem IFNγ die Proliferation der Tachyzoiten im Gehirn infizierter Mäuse durch Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten hemmt (Suzuki, 1999). Zusätzlich zu dem von T-Zellen produzierten IFNγ ist eine Produktion von IFNγ durch Nicht-T-Zellen notwendig, um eine Reaktivierung der Infektion zu verhindern (Kang & Suzuki, 2001). Auch TNFα ist bei der Aktivierung von Mikroglia und Astroglia beteiligt (Chao et al., 1994). Zusätzlich wird bei der von IFNγ–abhängigen Resistenz gegen intrazelluläre Pathogene IL-12 benötigt (Yap et al., 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass hirneigene Zellen als induzierbare NO-Synthase (iNOS)-unabhängige Effektoren der von IFNγ und TNFα-vermittelten Immunität in vivo fungieren (Yap & Sher, 1999). Folglich ist iNOS wichtig für einwandernde Zellen.

Unter der Infektion kommt es zu einer erhöhten Expression von GM-CSF in vivo (Gazzinelli et al., 1993; Hunter et al., 1992). Eine Behandlung von Mikroglia mit GM-CSF resultiert in ihrer Aktivierung und Hemmung der intrazellulären Replikation der Tachyzoiten (Fischer et al., 1993b). Es wurde gezeigt, dass die Synthese von NO für die antiparasitäre Aktivität der Mikroglia verantwortlich ist, da sie mit N^G-Monomethyl-L-Arginin antagonisierbar war (Fischer et al., 1993b). GM-CSF ist notwendig für die Wachstumshemmung der Toxoplasmen in Hirnzellen und die Kontrolle einer chronischen Infektion im ZNS. In der vorliegenden Arbeit wurde bei Hirnzellen aus GM-CSF defizienten Mäusen eine sowohl durch endogenes als auch exogenes GM-CSF vermittelte antiparasitäre Aktivität bei der Infektion mit *Toxoplasma gondii* beobachtet. Als eine für DC neue, T-Zell unabhängige Funktion wurde eine antiparasitäre Aktivität an $CD11c^+$ Zellen nachgewiesen, welche über

lösliche Faktoren vermittelt wird. Eine Beteiligung von IFNγ, das als einziges Zytokin bislang mit der antimikrobiellen Funktion von Mikrogliazellen assoziiert ist, wurde durch fehlende IFNγ-Produktion auf mRNA Ebene ausgeschlossen.

Unreife DC sind phagozytisch aktiv und wurden primär hinsichtlich ihrer T-zellstimulatorischen Funktion charakterisiert. Es wurde hier erstmals gezeigt, dass diese Zellen auch einen antiparasitären Effekt vermitteln. Der Mechanismus dieser Aktivität und die mögliche Beteiligung der iNOS ist noch nicht geklärt. Ebenso unklar ist noch, ob diese Aktivität im ZNS neurotoxisch wirkt.

5 Zusammenfassung

Die hier zusammengefassten Ergebnisse beschreiben eine Entwicklung von hirneigenen Zellen zu DC. Dabei wurden reife DC im entzündeten Hirn anhand der Expression eines Markergens nachgewiesen.

Unter dem Einfluss von GM-CSF entwickeln sich in Primärkulturen aus dem neonatalen Maushirn Mikrogliazellen, die eine dendritische Morphologie aufweisen und phänotypisch und funktionell unreifen myeloiden DC gleichen. Ohne weitere Auftrennung waren diese Mikrogliazellen in der MLR wenig effektive Stimulatoren für alloreaktive, naive T-Zellen. Für $CD11c^+$ Zellen, die aus GM-CSF-abhängig differenzierter Mikroglia isoliert worden waren, wurde das Potential zu funktionell aktiven DC zu reifen, nachgewiesen. Nach Ligation von CD40 waren die Zellen befähigt naive T-Zellen zu stimulieren. Damit wurde gezeigt, dass aus Mikrogliavorläufern funktionelle DC entstehen können.

Mit CD83 wurde ein zellspezifischer Marker reifer DC an Hirnzellen erstmals nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass CD83 zum einen in vitro in Hirnzellkulturen exprimiert wird und zum anderen mononukleäre Hirnzellen diesen Marker exprimieren. Hierbei ist die Expression dieses Markers auf die Population CD11c-positiver Zellen beschränkt. Damit wurde gezeigt, dass $CD11c^+$ mononukleäre Hirnzellen reife DC enthalten und dass solche Zellen aus Mikroglia entstehen können. Im untersuchten Modell der Maus-Toxoplasmose zeigt die zeitliche Veränderung in der zellulären CD83 Expression eine Parallele zum Verlauf der Infektion des ZNS: Die Kinetik impliziert ein sehr frühes Erscheinen reifer DC im Hirn, das bereits vor der histologisch sichtbaren Entzündung einsetzt und mit Beginn der Enzephalitis nochmals gesteigert wird.

Als eine für DC neue, T-Zell unabhängige Funktion wurde eine antiparasitäre Aktivität an unreifen DC aus Mikrogliakulturen nachgewiesen. Damit erhalten DC neben ihrer Funktion als APC eine neue Rolle als antimikrobielle Effektorzellen.

6 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle(n)
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cpm	counts per minute
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2'-dioxetane 3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.3,7] decan} -4-yl) phenyl phosphat
C_T	treshold cycle(s)
d	Tag
DC	Dendritische Zelle(n)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fötales Kälberserum
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
Gln	Glutamin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
G3PDH	Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
h	Stunde(n)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin(e)
IL	Interleukin
IMDM	Iscove`s modified Dulbecco`s medium
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	magnetic cell sorting

mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
MLR	mixed leucocyte reaction
MZ	Milzzellen
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
sCD40L	löslicher CD40 Ligand
SD	standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Citrat-gepufferte Salzlösung
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Toxoplasmenenzephalitis
TNF	Tumornekrosefaktor
ZNS	Zentralnervensystem
ZZ	Zellzahl
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

7 Literaturverzeichnis

Alliot F., Lecain E., Grima B. & Pessac B. (1991) Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1541-1545.

Aloisi F., De Simone R., Columba-Cabezas S., Penna G. & Adorini L. (2000a) Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. *J. Immunol.* 164: 1705-1712.

Aloisi F., Ria F. & Adorini L. (2000b) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol. Today* 21: 141-147.

Ardavin C., Wu L., Li C. L. & Shortman K. (1993) Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously within the thymus from a common precursor population. *Nature* 362: 761-763.

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y. J., Pulendran B. & Palucka K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Ann. Rev. Immunol.* 18: 767-811.

Banchereau J. & Steinman R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.

Barker C. F. & Billingham R. E. (1977) Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol*. 25: 1-54.

Bauer J., Bradl M., Hickey W. F., Forss-Petter S., Breitschopf H., Linington C., Wekerle H. & Lassmann H. (1998) T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *Am. J. Pathol*. 153: 715-724.

Berchtold S., Mühl-Zürbes P., Heufler C., Winklehner P., Schuler G. & Steinkasserer A. (1999) Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of the murine CD83 molecule which is specifically upregulated during dendritic cell maturation. *FEBS Letters* 461: 211-216.

Carson M. J., Reilly C. R., Sutcliffe J. G. & Lo D. (1999) Disproportionate recruitment of CD8+ T cells into the central nervous system by professional antigen-presenting cells. *Am. J. Pathol.* 154: 481-494.

Carson M. J., Reilly C. R., Sutcliffe J. G. & Lo D. (1998) Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* 22: 72-85.

Celada A. & Nathan C. (1994) Macrophage activation revisited. *Immunol. Today* 15: 100-102.

Chao C. C., Anderson W. R., Hu S., Martella A., Gekker G. & Peterson P. K. (1993) Activated microglia inhibit *Toxoplama gondii* via a nitric oxide-mechanism. *Cli. Immunol. Immunopathol.* 67: 178-183.

Chao C. C., Gekker G., Hu S. & Peterson P. K. (1994) Human microglia cell defense against *Toxoplasma gondii. J. Immunol*. 152: 1246-1252.

Chirgwin J. M., Przybyla A. E., MacDonald R. J. & Rutter W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem*. 18: 5294-5301.

Cserr H. F. & Knopf P. M. (1992) Cervical lymphatics, the blood brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol. Today* 13: 507-512.

De Smetd T., Pajak B., Muraille E., Lespagnard L., Heinen E., De Baetselier P., Urbain J., Leo O. & Moser M. (1996) Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J. Exp. Med.* 184: 1413-1424.

De St. Groth S. F. & Scheidegger D. (1980) Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods* 35: 1-21.

Denkers E. Y., Gazzinelli R. T., Martin D. & Sher A. (1993) Emergence of $NK1.1^+$ cells as effectors of IFN-γ dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. *J. Exp. Med*. 178: 1465-1472.

Dubey J. P. (1997) Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Euk. Microbiol*. 44: 592-602.

Dubey J. P. & Beattie C. P. (1988) Toxoplasmosis of animals and man. *Boca Raton, FL. CRC Press* pp. 1-220.

Dubey J. P. & Frenkel J. K. (1976) Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of toxoplasma cysts. *J. Protozool.* 23: 537-546.

Fierz W., Endler B., Reske K., Wekerle H. & Fontana A. (1985) Astrocytes as antigen-presenting cells. I. Induction of Ia antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effect on antigen presentation. *J. Immunol*. 134: 3785-3793.

Fischer H. G. & Bielinsky A. K. (1999) Antigen presentation function of brain derived dendriform cells depends on astrocyte help. *Int. Immunol.* 11: 1265-1273.

Fischer H. G., Bielinsky A. K., Nitzgen B., Däubener W. & Hadding U. (1993a) Functional dichotomy of mouse microglia developed in vitro: differential effects of macrophage and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on cytokine secretion and antitoxoplasmic activity. *J. Neuroimmunol*. 45: 193-202.

Fischer H. G., Bonifas U. & Reichmann G. (2000) Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii. J. Immunol.* 164: 4826-4834.

Fischer H. G., Nitzgen B., Germann T., Degitz K., Däubener W. & Hadding U. (1993b) Differentiation driven by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor endows microglia with interferon-γ-independent antigen presentation function. *J. Neuroimmunol*. 42: 87-96.

Fischer H. G., Nitzgen B., Reichmann G. & Hadding U. (1997) Cytokine responses induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglial cells. *Eur. J. Immunol*. 27: 1539-1548.

Fischer H. G. & Reichmann G. (2001) Brain dendritic cells and macrophages/ microglia in central nervous system inflammation. *J. Immunol.* 166: 2717-2726.

Ford A. L., Foulcher E., Lemckert F. A. & Sedgwick J. D. (1996) Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *J. Exp. Med*. 184: 1737-1745.

Frei K., Siepel C., Groscurth P., Bodmer S., Schwerdel C. & Fontana A. (1987) Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-γ-treated microglial cells. *Eur. J. Immunol.* 19: 689-694.

Fujimoto Y., Tu L., Miller A. S., Bock C., Fujimoto M., Doyle C., Steeber D. A. & Tedder T. F. (2002) CD83 expression influences $CD4^+$ T-cell development in the thymus. *Cell* 108: 755-767.

Gazzinelli R. T., Eltoum I., Wynn T. A. & Sher A. (1993) Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-α and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J. Immunol*. 151: 3672-3681.

Gazzinelli R. T., Hieny S., Wynn T., Wolf S., & Sher A. (1993) Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte independent induction of interferon-γ by an intracellular parasite and reduces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6115-6119.

Gazzinelli R. T., Wysocka M., Hayashi S., Denkers E. Y., Hieny S., Caspar P., Trinchieri G. & Sher A. (1994) Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii. J. Immunol.* 153: 2533-2543.

Gehrmann J., Gold R., Linington C., Lannes-Vieira J., Wekerle H. & Kreutzberg G. (1993) Microglial involvement in experimental autoimmune inflammation of the central and peripheral nervous system. *Glia* 7: 50-59.

Giulian D. & Ingemann J. E. (1988) Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J. Neurosci*. 8: 4707-4717.

Graeber M. B., Streit W. J., Buringer D., Sparks D. L. & Kreutzberg G. W. (1992) Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II perivascular cells in histologically normal human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 51: 303-311.

Granucci F., Ferrero E., Foti M., Aggujaro D., Vettoretto K. & Ricciardi-Castagnoli P. (1999) Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microb. Inf.* 1: 1079-1084.

Hailer N. P., Heppner F. L., Haas D. & Nitsch R. (1998) Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. *Brain Pathol*. 8: 459-474.

Hathcock K. S. (1991) T cell enrichment by nonadherence to nylon. *Current Protocols in Immunol.* 3.2.1-3.2.4

Hao C., Guilbert L. J. & Fedoroff S. (1990) Production of colony-stimulating-factor-1 (CSF-1) by mouse astroglia in vitro. *J. Neurosci. Res*. 27: 314-323.

Hertz L., McFarlin D. E. & Waksman B. H. (1990) Astrocytes: auxiliary cells for immune response in the central nervous system? *Immunol. Today* 11: 265-268.

Hickey W. F. & Kimura H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone-marrow derived and present antigen in vivo. *Science* 239: 290-292.

Hunter C. A., Roberts C. W. & Alexander J. (1992) Kinetics of cytokine mRNA production in the brains of mice with progressive toxoplasmic encephalitis. *Eur. J. Immunol.* 22: 2317-2322.

Inaba K., Inaba M., Romani N., Aya H., Deguchi M., Ikehara S., Maramatsu S. & Steinmann R. M. (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med*. 176: 1693-1702.

Irani D. N. (1998) The susceptibility of mice to immune-mediated neurologic disease correlates with the degree to which their lymphozytes resist the effects of brain-derived gangliosides. *J. Immunol*. 161: 2746-2752.

Kang H. & Suzuki Y. (2001) Requirement of non T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain. *Infect. Immun.* 69: 2920-2927.

Karasuyama H. & Melchers F. (1988) Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur. J. Immunol.* 18: 97-104.

Kozlow E. J., Wilson G. L., Fox C. H. & Kehrl J. H. (1993) Substractiv cDNA cloning of a novel member of the Ig gene superfamily expressed at high levels in activated B lymphozytes. *Blood* 81: 454-461.

Krakowski M. L. & Owens T. (2000) Naive T-lymphozytes traffic to inflamed central nervous system, but require antigen recognition for activation. *Eur. J. Immunol.* 30: 1002-1009.

Kreutzberg G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 19: 312-318.

Kruse M., Rosorius O., Krätzer F., Bevec D., Kuhnt C., Steinkasserer A., Schuler G. & Hauber J. (2000) Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J. Exp. Med.* 191: 1581-1590.

Lampson L. (1987) Molecular bases of the immune response to neural antigens. *Trends Neurosci*. 10: 211-216.

Lechmann M., Berchtold S., Hauber J. & Steinkasserer A. (2002) CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol*. 23: 273-275.

Lu L., Woo J., Rao A. S., Li Y., Watkins S. C., Qian S., Starzl T. E., Demetris A. J. & Thompson A. W. (1994) Propagation of dendritic cell progenitors from normal mouse liver using granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and their maturational development in the presence of Type-1 collagen. *J. Exp. Med*. 179: 1823-1834.

Lyons J. A., Zhao M. L. & Fritz R. B. (1999) Pathogenesis of acute murine encephalomyelitis II. Th1 phenotype of the inducing population is not sufficient to cause disease. *J. Neuroimmunol*. 93: 26-36.

Malipiero U. V., Frei K. & Fontana A. (1990) Production of hemopoetic colony-stimulating factors by astrocytes. *J. Immunol*. 144: 3816-3821.

Matyszak M. K., Lawson L. J., Perry V. H. & Gordon S. (1992) Stromal macrophages of the choroid plexus situated at an interface between the brain and peripheral immune system constituvely express major histocompatibility class II antigens. *J. Neuroimmunol.* 40: 173-182.

Matyszak M. K. & Perry V. H. (1996) The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience* 74: 599-608.

Mc Menamin P. G. (1999) Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J. Comp. Neurol.* 405: 553-562.

Metcalf D. (1989) The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 339: 27-30.

Metlay J. P., Witmer-Pack M. D., Agger R., Crowley M. D., Lawless D. & Steinman R. M. (1990) The distinct leucozyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 171: 1753-1771.

Pashenkov M., Teleshova N., Kouwenhoven M., Smirnova T., Jin Y. P., Kostulas V., Huang Y. M., Pinegin B., Boiko A. & Link H. (2002) Recruitment of dendritic cells to the cerebrospinal fluid in bacterial infections. *J. Neuroimmunol.* 122: 106-116.

Pfefferkorn E. R. & Pfefferkorn L. C. (1977) Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J. Protozool.* 24: 449-453.

Pulendran B., Lingappa J., Kennedy M. K., Smith J., Teepe M., Rudensky A., Maliszewski C. R. & Maraskovky E. (1997) Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in Flt3 ligand-treated mice. *J. Immunol*. 159: 2222-2231.

Pulendran B., Smith J. L., Caspary G., Brasel K., Pettit D., Marakovsky E. & Maliszewski C. R. (1999) Distinct dendritic subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1036-1041.

Reis e Sousa C., Hieny S., Scharton-Kersten T., Jankovic D., Charest H., Germain R. N. & Sher A. (1997) In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleucin 12 by dendritic cells and their redistribution to T-cell areas. *J. Exp. Med*. 186: 1819-1829.

Reis e Sousa C., Sher A. & Kaye P. (1999) The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr. opin. Immunol*. 11: 392-399.

Rissoan M. C., Soumelis V., Kadowaki N., Grouard G., Briere F., de Waal Malefyt R. & Liu Y. J. (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritical cell differentiation. *Science* 283: 1183-1186.

Roake J. A., Rao A. S., Morris P. J., Larsen C. P., Hankins D. F. & Austyn J. M. (1995) Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleucin 1. *J. Exp. Med.* 181: 2237-2247.

Robert C., Fuhlbrigge R. C., Kieffer J. D., Ayehunie S., Hynes R. O., Cheng G., Grabbe S., von Andrian H. U. & Kupper T. S. (1999) Interaction of dendritic cells with skin endothelium: a new perspective on immunosurveillance. *J. Exp. Med.* 189: 627-636.

Sanford K. K., Earle W. R. & Likely G. D. (1948) The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 9: 229-246.

Santambrogio L., Belyanskaya S. L., Fischer R. F., Cipriani B., Brosnan C. F., Ricciardi-Castagnoli P., Stern L. J., Strominger J. L. & Riese R. (2001) Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6295-6300.

Saunders D., Lucas K., Ismaili J., Wu L., Maraskovski E., Dunn A., Metcalf D. & Shortman K. (1996) Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med*. 184: 2185-2196.

Schreurs M. W. J., Eggert A. A. O., de Boer A. J., Figdor C. G. & Adema G. J. (1999) Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29: 2835-2841.

Schulz O., Edwards D. A., Schito M., Aliberti J., Manickasingham S., Sher A. & Reis e Sousa E. (2000) CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 13: 453-462.

Sedgwick J. D. & Hickey W. F. (1997) Antigen presentation in the central nervous system. In *Immunology of the Nervous system* Keane R. W. & Hickey W. F., eds. *Oxford University Press, New York* pp. 364-418.

Sedgwick J. D., Schwender S., Imrich H., Dorries R., Butcher G. W. & ter Meulen V. (1991) Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7438-7442.

Serafini B., Columba-Cabezas S., Di Rosa F. & Aloisi F. (2000) Intracerebral recruitment and maturation of dendritc cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* 157: 1991-2002.

Serot J. M., Foliguet B., Béné M. C. & Faure G. C. (1997) Ultrastructural and immunohistological evidence for dendritic-like cells within human choroid plexus epithelium. *NeuroReport* 8: 1995-1998.

Sharp P. A., Sugden B. & Sambrook J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus influenza* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochem*. 12: 3055-3063.

Sher A., Oswald I., Hieny S. & Gazzinelli R. T. (1993) *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-γ response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-α. *J. Immunol*. 150: 3982-3989.

Sher A. & Reis e Sousa C. (1998) Ignition of the type 1 response to intracellular infection by dendritic cell-derived interleukin-12. *Eur. Cytokine Netw.* 9: 65-68.

Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

Stanley E., Lieschke G. J., Grail D., Metcalf D., Hodgson G., Gall J. A. M., Mather D. W., Cebon J., Sinickas V. & Dunn A. R. (1994) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major pertubation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5592-5596.

Stanley R. & Heard P. M. (1977) Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J. Biol. Chem.* 252: 4305-4312.

Steinman R. M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 271-296.

Steinman R. M. & Cohn Z. A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137: 1142-1162.

Streit W. J., Graeber M. B. & Kreutzberg G. W. (1988) Functional plasticity of micoglia: a review. *Glia* 1: 301-307.

Streptoe R. J. & Thomson A. W. (1999) Dendritic cells in the liver, kidney, heart and pancreas. In *Dendritic cells* Lotze M. L. & Thomson A. W. eds. *Academic Press, San Diego* pp. 153.

Stout R. D. & Suttles J. (1996) The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol. Today* 17: 487-492.

Subauste C. S. & Remington J. S. (1993) Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr. Opin. Immunol*. 5: 532-537.

Suter T., Malipiero U., Otten L., Ludewig B., Muelethaler-Mottet A., Mach B., Reith W. & Fontana A. (2000) Dendritic cells and differential usage of the MHC class II transactivator promoters in the central nervous system in experimental autoimmune encephalitis. *Eur. J. Immunol.* 30: 794-802.

Suter T., Biollaz G., Gatto D., Bernasconi L., Herren T., Reith W. & Fontana A. (2003) The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 33: 2998-3006.

Suzuki Y. (1999) Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiol*. 201: 255-271.

Suzuki Y., Joh K., Kwon O. C., Yang Q., Conley F. K. & Remington J. S. (1994) MHC class I gene(s) in the D/L region but not the TNFα gene determines development of toxoplasmic encephalitis in mice. *J. Immunol*. 153: 4649-4654.

Suzuki Y., Orellana M. A., Schreiber R. D. & Remington J. S. (1988) Interferon-γ: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240: 516-518.

Twist C. J., Beier D. R., Disteche C. M., Edelhoff S. & Tedder F. (1998) The mouse CD83 gene: structure, domain organisation and chromosome localisation. *Immunogenetics* 48: 383-393.

Vieira P. L., DeJong E. C., Wierenga E. A., Kapsenberg M. L. & Kalinski P. (2000) Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J. Immunol.* 164: 4507-4512.

Vremec D. & Shortman K. (1997) Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs. Crosscorrelation of surface markers, changes with incubation and differences among thymus, spleen and lymph nodes. *J. Immunol.* 159: 565-573.

Watabe K., Osborne D. & Kim S. U. (1989) Phagocytic activity of human adult astrocytes and oligodendrocytes in culture. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 48: 499-506.

Weissman D., Li Y., Ananworanich J., Zhou L. J., Adelsberger J., Tedder T. F., Baseler M. & Fauci A. S. (1995) Three populations of cells with dendritic morphology exist in peripheral blood, only one of which is infectable with human immunodefficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 826-830.

Wibanks G. A. & Streilein J. W. (1992) Fluids from immune privileged sites endow macrophages with the capacity to induce antigen-specific immune deviation via a mechanism involving transforming growth factor-β. *Eur. J. Immunol.* 22: 1031-1036.

Winser J., Verlinde J. D., Van Thiel P. H., Davel J. & Van der Elst P. (1948) Isolation of toxoplasma from cerebrospinal fluid of a living infant in Holland. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 67: 292.

Winzler C., Rovere P., Rescigno M., Granucci F., Penna G., Adorini L., Zimmermann V. S., Davoust J. & Ricciardi-Castagnoli P. (1997) Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185: 317-328.

Würtzen P. A., Nissen M. H. & Claesson M. H. (2001) Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production. *Scandinavian J. Immunol.* 53: 579-587.

Yanish-Perron C., Vieira J. & Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and hosts strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

Yap G., Pesin M. & Sher A. (2000) Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-γ production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii. J. Immunol*. 165: 628-631.

Yap G. & Sher A. (1999) Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-γ-and tumor necrosis factor (TNF)-α-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 189: 1083-1091.

Zhou L. J., Schwarting R., Smith H. S. & Tedder T. F. (1992) A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells and activated lymphozytes is a new member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.* 149: 735-742.

Zhou L. J. & Tedder T. F. (1995) Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobin superfamily. *J. Immunol.* 154: 3821-3835.

Zhou L. J. & Tedder T. F. (1996) $CD14^+$ blood monocytes can differentiate into functionally mature $CD83^+$ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2588-2592.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Morphologie von DC 5

Abb. 2. Merkmale unreifer und reifer DC 7

Abb. 3. Allostimulatorische Aktivität GM-CSF-abhängig differenzierter Mikrogliazellen 32

Abb. 4. Allostimulatorische Aktivität unterschiedlich ausgereifter CD11c-positiver Mikrogliazellen 33

Abb. 5. CD83 kodierende Sequenz und RT-PCR von MZ 35

Abb. 6. Nachweis von CD83-Transkripten in Maus-Hirnzellen und Milz-DC 36

Abb. 7. Expression von CD83 in Hirnzellen und Mikroglia 37

Abb. 8. Expression von CD83 in mononukleären Hirnzellen und Milz-DC 39

Abb. 9. Kinetik der Expression von CD83 im ZNS bei einsetzender Enzephalitis ... 41

Abb. 10. GM-CSF-abhängige Entwicklung dendritischer Morphologie in vitro 42

Abb. 11. Kontrolle der Expression von GM-CSF in Hirnzellen aus GM-CSF-defizienten und Wildtyp-Mäusen 43

Abb. 12. Anti-parasitärer Effekt von GM-CSF in Hirnzellkulturen 44

Abb. 13. GM-CSF abhängige anti-parasitäre Aktivität von Gliazellen 45

Abb. 14. Hirnzell-Primärkultur nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* Bradyzoiten ... 46

Abb. 15. Anti-parasitärer Effekt von GM-CSF und $CD11c^+$ Mikrogliazellen in Hirnzell-Primärkulturen 47

Abb. 16. Postulierte Stufen der intrazerebralen Entwicklung funktioneller DC 56

9 Dank

...vergiss nie, dass jeder Erfolg
viele Mütter und Väter hat –
Menschen, die dich darauf vorbereitet haben,
die dich begleitet und ermutigt haben,
die an dich geglaubt haben
und dir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Rainer Haak

Auf diesem Wege möchte ich allen danken, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit zustande gekommen ist, insbesondere bedanke ich mich bei

Herrn Professor Dr. *U. Hadding* und Herrn Professor Dr. *K. Pfeffer* für ihre Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Professor Dr. *H.-G. Fischer* und Frau PD Dr. *G. Reichmann* für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die persönliche Betreuung dieser Arbeit sowie die Hilfestellungen und Ratschläge - und nicht zuletzt für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Frau Professor Dr. *Helga Idel* für die Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten.

allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität von denen jeder dazu beigetragen hat, dass ich gerne dort gearbeitet habe. Ich bedanke mich für die ständige Hilfsbereitschaft und das außerordentlich gute Arbeitsklima im alltäglichen Laborbetrieb. Besonders herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Fischer bedanken, die mich stets mit Rat und Tat unterstützt haben.

Herrn Professor Dr. *H. Luhmann* dafür, dass ich im Graduiertenkolleg 'Pathologische Prozesse des Nervensystems: Vom Gen zum Verhalten' mitarbeiten durfte und die Möglichkeit hatte Einblicke in die klinische Forschung anderer Fachbereiche zu bekommen.

meiner *Familie* und meinem Mann *Stephan* dafür, dass sie immer für mich da waren.

10 Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher noch von keiner medizinischen Fakultät abgelehnt.
Ich bin mir darüber klar, dass der Bruch der obigen Eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zur Folge hat, dass die Fakultät die Promotion widerruft.

Mönchengladbach, den 08.02.2004

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name:	Adams
Vorname:	Sabine
Geburtsname:	Volkmann
Geburtsdatum:	25.07.1975
Geburtsort:	Neuss
Anschrift:	Volksbadstraße 15
	41065 Mönchengladbach
Familienstand:	verheiratet
Konfession:	evangelisch
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung:

1982 – 1986	Tannenbusch-Grundschule in Dormagen
1986 – 1995	Leibniz-Gymnasium in Dormagen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
darin 1992	Ballard Highschool in Seattle, WA, USA

Studium:

1995 – 2003	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
08/1999	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2002	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2003	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

10/2002 – 10/2003	Praktisches Jahr im Lukaskrankenhaus in Neuss
10/2002 – 01/2003	Prof. Dr. Kühl, Klinik für Kinder und Jugendliche
02/2003 – 03/2003	Dr. Hermichen, Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
04/2003 – 05/2003	Prof. Dr. Goretzki, Klinik für Allgemeinchirurgie
05/2003 – 07/2003	Prof. Dr. Merx, Medizinische Klinik I
07/2003 – 10/2003	Prof. Dr. Czygan, Medizinische Klinik II

Promotion:

02/2000 – 12/2001	Promotionsarbeit bei Prof. Dr. H. G. Fischer und PD Dr. G. Reichmann, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Thema: „Funktionelle Reifung Dendritischer Zellen im Zentralnervensystem“

Mönchengladbach, den 08.02.2004 gez.: Sabine Adams

Zusammenfassung

Die hier zusammengefassten Ergebnisse beschreiben eine Entwicklung von hirneigenen Zellen zu DC. Dabei wurden reife DC im entzündeten Hirn anhand der Expression eines Markergens nachgewiesen.

Unter dem Einfluss von GM-CSF entwickeln sich in Primärkulturen aus dem neonatalen Maushirn Mikrogliazellen, die eine dendritische Morphologie aufweisen und phänotypisch und funktionell unreifen myeloiden DC gleichen. Ohne weitere Auftrennung waren diese Mikrogliazellen in der MLR wenig effektive Stimulatoren für alloreaktive, naive T-Zellen. Für $CD11c^+$ Zellen, die aus GM-CSF-abhängig differenzierter Mikroglia isoliert worden waren, wurde das Potential zu funktionell aktiven DC zu reifen, nachgewiesen. Nach Ligation von CD40 waren die Zellen befähigt naive T-Zellen zu stimulieren. Damit wurde gezeigt, dass aus Mikrogliavorläufern funktionelle DC entstehen können.

Mit CD83 wurde ein zellspezifischer Marker reifer DC an Hirnzellen erstmals nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass CD83 zum einen in vitro in Hirnzellkulturen exprimiert wird und zum anderen mononukleäre Hirnzellen diesen Marker exprimieren. Hierbei ist die Expression dieses Markers auf die Population CD11c-positiver Zellen beschränkt. Damit wurde gezeigt, dass $CD11c^+$ mononukleäre Hirnzellen reife DC enthalten und dass solche Zellen aus Mikroglia entstehen können. Im untersuchten Modell der Maus-Toxoplasmose zeigt die zeitliche Veränderung in der zellulären CD83 Expression eine Parallele zum Verlauf der Infektion des ZNS: Die Kinetik impliziert ein sehr frühes Erscheinen reifer DC im Hirn, das bereits vor der histologisch sichtbaren Entzündung einsetzt und mit Beginn der Enzephalitis nochmals gesteigert wird.

Als eine für DC neue, T-Zell unabhängige Funktion wurde eine antiparasitäre Aktivität an unreifen DC aus Mikrogliakulturen nachgewiesen. Damit erhalten DC neben ihrer Funktion als APC eine neue Rolle als antimikrobielle Effektorzellen.

gez.: PD Dr. Gaby Reichmann