



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Vergleichende *in vivo* Analysen der immunmodulatorischen Effekte von IFN β in antiviralen Immunantworten und ZNS Autoimmunität

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Ann-Kathrin Pulm
aus Düsseldorf

Düsseldorf, März 2018

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

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

Berichtersteller

1. Frau Prof. Dr. Stefanie Scheu

2. Herr Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung:

Veröffentlichung der Dissertation

Teile der vorliegenden Dissertation wurden vorab veröffentlicht:

Kocur M*, Schneider R*, Pulm AK*, Bauer J, Kropp S, Gliem M, Ingwersen J, Goebels N, Alferink J, Prozorovski T, Aktas O, and Scheu S. *IFN β secreted by microglia mediates clearance of myelin debris in CNS autoimmunity.* Acta Neuropathol Commun. 2015; 3: 20.

*geteilte Erstautorenschaft

„Mut steht am Anfang des Handelns, Glück am Ende“

Demokrit (460 - 370 v. Chr.)

Zusammenfassung

Typ I Interferone (IFNs) sind pleiotrope Zytokine, die initiale Regulatoren der angeborenen und Induktoren der adaptiven Immunabwehr gegen verschiedene Pathogene darstellen. Gleichzeitig vermitteln sie aber auch ambivalente Effekte in der Autoimmunität. IFN β gehört zu dieser Familie monomerer Zytokine. Während es im Falle einer viralen Infektion durch Induktion des sogenannten antiviralen Status die Vermehrung und Ausbreitung des Pathogens hemmt, kann IFN β aber auch einen detrimetellen Einfluss ausüben wie z.B. bei einer bakteriellen Infektion mit *Listeria monocytogenes*. Ähnliches konnte auch für seine Rolle in der Autoimmunität beschrieben werden. In der Behandlung von Multipler Sklerose wird IFN β aufgrund seiner positiven Effekte bereits seit Jahrzehnten als Therapeutikum eingesetzt, und auch im entsprechenden Tiermodell der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) ist eine protektive Wirkung nachgewiesen. Im Gegensatz hierzu wurden für Lupus erythematodes detrimetelle Effekte von IFN β gezeigt. Ein weiterer Aspekt der Forschung ist seine immunmodulatorische Wirkung auf die Expression anderer Zytokine wie Interleukin-12 (IL-12). Hier ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt, ob es sich um eine Ko- oder Gegenregulation handelt und welchen Effekt diese auf einen Krankheitsverlauf hat.

All diese Aspekte machen IFN β zu einem wichtigen Gegenstand der Immunforschung. Seine zelluläre Quelle und die Mechanismen, die seine Effekte hervorrufen, konnten bisher jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden. Um die Expression von IFN β in der EAE oder nach viraler Infektion auf Einzelzellebene charakterisieren zu können wurde ein bicistronisches Zytokin-Fluoreszenz Reportermausmodell für IFN β bzw. ein Doppel-Reportermausmodell für IFN β und IL-12 eingesetzt.

Nach Infektion mit dem Lymphozytischen Choriomeningitis Virus (LCMV) konnten dendritische Zellen als die Hauptproduzenten von IFN β und IL-12 identifiziert werden. In Mäusen mit einer Defizienz für den Typ I IFN Rezeptor (IFNAR1^{-/-}) waren die IL-12 Serumwerte im Vergleich zu WT Mäusen nach akuter Infektion erhöht. Als Hauptzytokinproduzenten in der Milz wurden Subpopulationen dendritischer Zellen identifiziert. Während plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs) beinahe keine basale Expression von IL-12 aufweisen, wurden sie nach LCMV

Infektion, in Abhängigkeit des Typ I IFN Rezeptor Signalwegs, zu sehr potenten Produzenten dieses Zytokins. Mit Hilfe dieser Daten konnten erstmalig simultan IFN β und IL12 Produzenten auf Einzelzellebene in einem komplexen viralen Infektionsmodell charakterisiert werden und mögliche Effekt des Typ I IFN Rezeptor Signalweges auf die Expression von IL-12 analysiert werden.

In der EAE wurde IFN β hauptsächlich von einer Subpopulation aktivierter Mikroglia exprimiert, die vornehmlich innerhalb aktiver Läsionen im ZNS lokalisierten. In demyelinisierten organotypischen zerebellären Schnittkulturen (OSCs) kolokalisierten diese Zellen mit Myelin Debris. Exogen-verabreichtes rekombinantes IFN β führte zu einer gesteigerten phagozytotischen Aktivität der Mikroglia *in vitro* und einer erhöhten Expression Phagozytose-assoziiierter Gene. Darüber hinaus konnte die Stimulation mit IFN β die Lokalisation der Mikroglia in unmittelbarer Nähe von Myelin Debris *in situ* induzieren. Zu guter Letzt konnte gezeigt werden, dass IFN β -produzierende Mikroglia im Gegensatz zu den nicht-produzierenden Zellen, den Abbau von Myelin Debris innerhalb demyelinisierter OSCs steigern. Die Ergebnisse dieses Projektes erbrachten neue Erkenntnisse über die Funktion von IFN β -produzierenden Zellen innerhalb demyelinisierender Prozesse im ZNS und machen sie damit zu einem möglichen Ansatzpunkt für neue Therapien.

Summary

Type I Interferons (IFNs) are pleiotropic cytokines known as initial regulators of innate and inductors of adaptive immune responses against diverse pathogens, but also for their ambivalent effects in context of autoimmunity. IFN β belongs to this family of monomeric cytokines. While during viral infections it inhibits viral replication and spread through induction of the so called anti-viral status, it can also have detrimental effects e.g. in bacterial infections caused by *Listeria monocytogenes*. Similar is its role in autoimmunity. For the treatment of multiple sclerosis it has been used as a standard therapeutic for decades and in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal model a protective effect has been proven. In contrast, detrimental effects of IFN β have been investigated for lupus erythematosus. Another aspect of research is its immunomodulatory effect on the expression of other cytokines such as Interleukin-12 (IL-12). Here, it is still unclear if there is a co- or counterregulation of both cytokines and how this affects the course of a disease.

All these aspects make IFN β an important topic of immune research. Its cellular source and the mechanisms that cause its effects are not fully understood. To characterize the IFN β expression on a single cell level during EAE or after viral infection a bicistronic fluorescent cytokine reporter mouse model for IFN β and a double reporter mouse model for IFN β and IL-12 was used, respectively.

After infection with the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) dendritic cells were identified as major source of IFN β and IL-12. Serum levels of IL-12 were increased in mice deficient for the type I IFN receptor (IFNAR1^{-/-}) compared to WT mice after acute infection. Splenic DC subsets were found to be the most prominent cytokine-producing cell populations. While plasmacytoid dendritic cells (pDCs) show almost no basal IL-12 expression they become very potent producers after LCMV infection in an IFNAR1-dependent manner. These data, for the first time, characterize IFN β and IL12 producers simultaneously at the single cell level in a complex viral infection model and analyze potential effects of the type I IFN pathway on the expression of IL-12.

During EAE IFN β was mainly produced by a subpopulation of activated microglia predominantly localized within active lesions of the CNS. Within demyelinated cerebellar organotypic slice cultures (OSCs) these cells co-localized together with

myelin debris. Exogenous administration of recombinant IFN β led to an enhanced phagocytotic activity of microglia *in vitro* and an increased expression of phagocytosis-associated genes. More importantly stimulation with IFN β induced the migration of microglia towards areas of high myelin debris content *in situ*. Finally, it could be shown that IFN β -producing microglia enhanced the removal of myelin debris within demyelinated OSCs while non-IFN β -producing cells did not.

The results of this project demonstrate new insights into the function of IFN β -producing cells within demyelinating processes in the CNS and thus make them a possible target for new therapies.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Immunität des zentralen Nervensystems	2
1.3 Antigen-präsentierende Zellen – Dendritische Zellen	3
1.4 Mikroglia	6
1.5 Zytokine – Botenstoffe der Immunabwehr	7
1.5.1 Typ I Interferone	8
1.5.2 Interleukin 12	10
1.5.3 Induktion von IFN β und IL-12	11
1.5.4 Einfluss der Typ I IFN Antwort auf die IL-12 Produktion	13
1.6 Das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV)	14
1.7 Multiple Sklerose	15
1.7.1 Therapiemodelle für Multiple Sklerose	17
1.7.2 Multiple Sklerose Therapie mit Interferon	17
1.7.3 Tiermodell der Multiplen Sklerose: Die Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	19
1.7.4 Pathogenese von MS und EAE	19
1.8 Zielsetzung der Dissertation	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Anästhetika	25
2.1.3 Enzyme	25
2.1.4 Kits und Reagenzien	26
2.1.5 TLR Agonisten	26
2.1.6 Antikörper	27
2.1.7 Oligonukleotide	28
2.1.8 Zellkultur-Medien	29
2.1.9 Puffer	29

2.1.10	Geräte	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Tierexperimente	32
2.2.1.1	Experimentaltiere	32
2.2.1.2	Das IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Reportermausmodell	33
2.2.1.3	Das IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ x IL-12p40 $^{\text{get40/get40}}$ Doppel-Reportermausmodell	35
2.2.1.4	<i>In vivo</i> Stimulation mit TLR-Agonisten	36
2.2.1.5	Infektion mit LCMV	36
2.2.1.6	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	37
2.2.1.7	Evaluierung des klinischen Scores der EAE-Tiere	37
2.2.2	Präparation von murinen Proben	38
2.2.2.1	Isolation von Serum aus Vollblut	38
2.2.2.2	Isolation von murinem Gewebe lymphatischer Organe	38
2.2.2.3	Isolation von murinem Gewebe aus dem ZNS	39
2.2.2.4	Präparation von Organen für die Analyse mittels Durchflusszytometrie	40
2.2.2.5	Präparation von Organen für die histologische Untersuchung	40
2.2.3	Zellkultur	40
2.2.3.1	Verwendete Zelllinien und Primärzellen	40
2.2.3.2	Kultivierung von Zelllinien	41
2.2.3.3	Isolation myeloider Zellen aus dem murinen Knochenmark	41
2.2.3.4	Differenzierung von Knochenmark-generierten GM-CSF DCs	42
2.2.3.5	Differenzierung von Knochenmark-generierten Flt3-L DCs	42
2.2.3.6	Isolation mononukleärer Zellen aus dem ZNS	42
2.2.3.7	Differenzierung von Mikroglia aus ZNS mononukleären Zellen	43
2.2.3.8	Stimulation und Infektion <i>in vitro</i> generierter Zellen	43
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	44

2.2.4.1	RNS Isolation	44
2.2.4.2	cDNS Synthese	44
2.2.4.3	Quantitative Real Time PCR	45
2.2.5	Immunbiologische Methoden	46
2.2.5.1	Extrazelluläre FACS-Färbung	46
2.2.5.2	Präparation von Zellen für die Zellsortierung	47
2.2.5.3	Immunhistologie	47
2.2.5.4	ELISA	48
2.3	Software	48
2.4	Statistik	48
2.5	Illustrationen	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Der Einfluss von IFN β und des Typ I IFN Rezeptor Signalwegs auf die IL-12 Expression in einem Modell der antiviralen Immunantwort	50
3.1.1	Der Einfluss des Typ I IFN Rezeptor Signalweges auf die IL-12 Produktion im Serum nach akuter LCMV Infektion und TLR Stimulation	50
3.1.2	Die Lokalisation der IL-12p40 und IFN β Produzenten in der Milz nach LCMV Infektion und TLR Stimulation in IFNAR1 ^{+/+} und IFNAR1 ^{-/-} Mäusen	53
3.1.3	Analyse der simultanen Expression von IL-12p40 und IFN β und des Einflusses des IFNAR1 auf die Zytokinproduktion mit Hilfe des IFN β ^{mob/mob} x IL-12 ^{get40/get40} Doppel-Reportermausmodells	58
3.1.4	Phänotypische Charakterisierung der IL-12p40- und IFN β -produzierenden Zellen	61
3.1.5	Vergleichende Analyse der Zellzahlen und Apoptoserate der Zytokinproduzenten in IFNAR1 ^{+/+} und IFNAR1 ^{-/-} Mäusen	63
3.2	Visualisierung von IFN β und die Analyse immunmodulatorischer Effekte im Kontext von ZNS Immunität	67
3.2.1	Charakterisierung der zellulären Quelle von IFN β während der EAE	67
3.2.2	Lokalisation der IFN β produzierenden Zellen innerhalb des ZNS am Höhepunkt der EAE	71
3.2.3	Charakterisierung der IFN β -produzierenden Zellen <i>in situ</i>	72

3.2.4	Untersuchung der Beteiligung von IFN β an phagozytotischen Prozessen innerhalb des ZNS	75
3.2.4.1	Der Einfluss von IFN β auf die Lokalisation von Mikroglia innerhalb von demyelinisiertem Gewebe und ihre phagozytotische Aktivität	75
3.2.4.2	Der Einfluss von IFN β auf den Abbau von Myelin Debris <i>in situ</i> und <i>in vivo</i>	79
3.2.5	IFN β produziert von Mikroglia und seine Beteiligung am Abbau von Myelin Debris in organotypischen zerebellären Schnittkulturen	83
3.2.6	Beteiligung der Autoren	84
4	Diskussion	86
4.1	Der Einfluss von IFN β und dem Typ I IFN Rezeptor Signalweg auf die IL-12 Expression in einem Modell der antiviralen Immunantwort - Ko-Regulation oder Abhängigkeit?	86
4.1.1	Ein deutlicher Anstieg von IL-12 und IFN β im Serum deutet auf eine IFNAR-unabhängige Sekretion im Kontext einer akuten LCMV Infektion hin	87
4.1.2	Die Präsenz der IL-12p40 und IFN β Produzenten innerhalb verschiedener Milzareale spricht für eine funktionspezifische Lokalisation der Zellen	89
4.1.3	IL-12p40 und IFN β konnten im IFN β ^{mob/mob} x IL-12 ^{get40/get40} Doppel-Reportermausmodell simultan gemessen werden und sind abhängig vom TLR-Stimulationsroute IFNAR-unabhängig exprimiert	91
4.1.4	Die Phänotypische Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie identifiziert die Hauptproduzenten von IL-12p40 und IFN β als Subpopulationen dendritischer Zellen	94
4.1.5	IFN β -produzierende pDCs zeigen eine selektive Apoptose in Abhängigkeit vom Typ I IFN Signalweg, während die IL-12p40 Produktion konstant bleibt	95
4.2	Visualisierung von IFN β und seine Effekte in der ZNS Autoimmunität	97
4.2.1	Phänotypische Charakterisierung der zellulären Quelle von IFN β während der EAE mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz Färbung	97

4.2.2	IFN β -produzierenden Zellen und ihre Lokalisation innerhalb des ZNS am Höhepunkt der EAE und <i>in situ</i> in organotypischen zerebellären Schnittkulturen	100
4.2.3	Der Einfluss von IFN β auf phagozytotische Prozesse im ZNS und den Abbau von Myelin Debris innerhalb organotypischer zerebellärer Schnittkulturen	101
5	Klinische Relevanz und abschließende Anmerkungen	104
6	Literaturverzeichnis	106
7	Anhang	124
7.1	Original Publikation: „IFN β secreted by microglia mediates clearance of myelin debris in CNS autoimmunity“	124
7.2	Abbildungsverzeichnis	140
7.3	Tabellenverzeichnis	142
7.4	Abkürzungsverzeichnis	143
	Eidesstattliche Erklärung	147
	Danksagung	149

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem höherer Lebewesen dient der effektiven Abwehr von eindringenden Pathogenen (Viren, Bakterien oder Parasiten), aber auch von körpereigenen autoreaktiven oder entarteten Zellen. Dieses komplexe System ist hochspezialisiert und basiert auf dem engen regulatorischen Zusammenspiel aus angeborenem und erworbenem (adaptivem) Immunsystem.

Die erste Antwort des Organismus auf ein Pathogen ist eine Entzündungsreaktion, die durch eine veränderte Permeabilität der physiologischen Barrieren, die Migration von Immunzellen mit potenter antimikrobieller Funktion zur ersten Abwehr, die Aktivierung des Komplementsystems und die Sekretion löslicher Botenstoffe wie Chemokine und Zytokine (Typ I Interferone und Interleukine u. a.) charakterisiert ist.

Dendritische Zellen (DCs), Natürliche Killerzellen (NK Zellen), Granulozyten und Makrophagen (M ϕ) bilden das zelluläre Kompartiment der angeborenen Immunantwort und tragen maßgebend zur frühen Eliminierung von Pathogenen bei. Diese Zellen werden durch die Erkennung Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMPs) über pathogen-spezifische Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) aktiviert (Kawai und Akira 2010). DCs und M ϕ bilden die Gruppe der Antigen-präsentierenden Zellen (APZs), die unter anderem für die Sekretion von Zytokinen im Verlauf der frühen Immunantwort, im Fall der DCs aber auch für die Aktivierung naiver T Zellen, essentiell sind. Sie bilden die Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (Janeway und Medzhitov 2002).

Die adaptive Immunantwort ist hochspezifisch und wird aktiviert, wenn Pathogene vom angeborenen Immunsystem nicht wirksam bekämpft werden konnten. T und B Lymphozyten bilden hier das zelluläre Kompartiment. Wichtige und notwendige Komponenten sind hier die klonale Expansion der verschiedenen Lymphozytenpopulationen und die Hypermutationen der Antigenrezeptoren, die die Anpassung an Infektionen und die Effektor-Funktion dieser Zellen begünstigen. Die Einteilung des adaptiven Immunsystems erfolgt in humorale und zellvermittelte Antwort, beide agieren über antigenspezifische Rezeptoren. Die humorale Im-

munantwort ist durch die B Lymphozyten und die Antikörpersekretion der Plasmazellen gegen extrazelluläre Pathogene charakterisiert. Die T Lymphozyten dagegen bilden die Hauptkomponente der zellvermittelten Immunantwort gegen intrazelluläre Mikroben. Sie erkennen die Antigene, die an Moleküle des Haupt-histokompatibilitätskomplex (MHC) gebunden sind, über den T Zell Rezeptor (TCR) (Zinkernagel und Doherty 1974).

Die Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems gehören zu den Leukozyten, die gemeinsam mit den Erythrozyten von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen abstammen.

1.2 Immunität des zentralen Nervensystems

Das zentrale Nervensystem (ZNS) besteht aus Gehirn und Rückenmark. Es wird konstant von residenten Mikroglia patrouilliert, aber nach neueren Erkenntnissen auch von Makophagen, DCs und T Zellen, die über das Blut zirkulieren (Ousman und Kubes 2012). Ihre Aufgabe ist es die Homöostase und damit die Funktion des ZNS aufrechtzuerhalten.

Obwohl Immunzellen aus der Peripherie im ZNS nur in relativ geringer Anzahl vorhanden sind, dienen sie auch hier dem Schutz vor schädlichen Substanzen. Sie überwachen spezielle Bereiche, die außerhalb des Parenchyms liegen, während Mikroglia innerhalb des Parenchyms die Hauptpopulation der für die Immunabwehr zuständigen Zellen darstellen (Hickey *et al.* 1991). Die Immunzellen gelangen über (a) nicht-perforierte vesikuläre Stromazellen der Blut-Liquor Schranke, die von den Epithelzellen des Choroid Plexus umgeben ist, (b) den perivaskulären Raum und (c) die postkapillaren Venen, die direkt in das Parenchym führen, ins ZNS (Ransohoff *et al.* 2003).

Die Bluthirnschranke (BHS) ist eine physiologische Barriere, die nicht nur dem Schutz des Gehirns vor zirkulierenden Pathogenen dient, sondern zudem das Eindringen von Immunzellen unter naiven Bedingungen verhindert. Die Hauptkomponente der BHS bilden die über „tight-junctions“ verbundenen Endothelzellen. Zwei weitere wichtige Zelltypen sind die Astrozyten, die die sogenannte Basallamina ausbilden, und die Perizyten, die der Gefäßstabilisierung dienen (Allt

und Lawrenson 2001). Bis auf den Bereich des Plexus choroideus ist das gesamte ZNS von der Peripherie konstant durch die BHS abgeschottet (Cserr und Bundgaard 1984).

1.3 Antigen-präsentierende Zellen – Dendritische Zellen

In ihrer Funktion als APZs stellen DCs die initialen Aktivatoren der Immunabwehr dar, wenn Pathogene die epithelialen Barrieren überwunden haben. Diese Zellen übernehmen eine vielseitige immunologische Rolle und werden vornehmlich anhand ihres Phänotyps, wie der Expression des Integrins CD11c und des Haupt-histokompatibilitätskomplex MHC Klasse II (MHCII), und ihrer Funktionalität, nämlich anhand ihrer einzigartigen Fähigkeit naive T Lymphozyten zu aktivieren, klassifiziert (Poltorak und Schraml 2015, Steinman und Idoyaga 2010, Steinman und Witmer 1978). Prinzipiell erfolgt die Einteilung in vier Subtypen: Langerhans Zellen, konventionelle DCs (cDCs), plasmazytoide DCs (pDCs) und inflammatorische DCs (Tab. 1) (Hespel und Moser 2012, Guilliams *et al.* 2010, Gi *et al.* 2009).

Tabelle 1: Subtypen muriner dendritischer Zellen; modifiziert nach Gi *et al.* 2009.

Subtyp	Eigenschaften		
	Gewebe	Funktion	TLRs
cDCs CD8 ⁺	Lymphatische Organe T-Zell Zone	APZ/Cross-Präsentation	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9
CD8 ⁻	Lymphatische Organe Marginalzone	APZ	1, 2, 3, 4, 6, 8, 9
pDCs	Blut, periphere lymphatische Organe	APZ	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9
Langerhans Zellen	Dermis	APZ	1, 3, 6, 7
Inflammatorische DCs	Inflammatorisches/infiziertes Gewebe	APZ/ Cross-Präsentation	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9

Dendritische Zellen sind Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Sie entstehen dem klassischen Modell nach aus den gemeinsamen Monozyten und DC Vorläuferzellen (MDPs), die von den LMPPs (lymphoid-primed multi-potent progenitors), einem Intermediat downstream der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen

(HSZs), abgeleitet sind (Abb. 1) (Iwasaki und Akashi 2007, Fogg *et al.* 2006). Aus den MDPs divergieren dann Ly6C^{+/-} Monozyten, Makrophagen und die gemeinsamen DC Vorläuferzellen (common dendritic cell precursors, CDPs) von denen sich die pre-DCs und pDCs ableiten (Poltorak und Schraml 2015, Liu und Nussenzweig 2010, Geissmann *et al.* 2010, Liu *et al.* 2009, Onai *et al.* 2007). Die terminale Ausdifferenzierung von pDCs aus den CDPs findet im Knochenmark statt (Ghosh *et al.* 2010, Cisse *et al.* 2008). Erst dann migrieren sie über das Blut ins Gewebe (Shortman *et al.* 2013, Reizis 2010). Die pre-DCs hingegen differenzieren erst im Gewebe zu konventionellen DCs, einschließlich der CD11b⁺ und CD11b⁻ Subpopulationen (Liu *et al.* 2009, Naik *et al.* 2006). Im lymphatischen Gewebe differenzieren sie zu CD11b⁺ oder CD8α⁺ residenten cDCs, wohingegen im nicht lymphatischen peripheren Gewebe die CD11b⁺ oder CD103⁺ cDCs patrouillieren (Steinman und Idoyaga 2010, Ginhoux *et al.* 2009, Liu *et al.* 2007).

Die Monozyten differenzieren wie die pDCs bereits im Knochenmark vollständig aus. Hier entscheidet der Eintritt in lymphatisches oder nicht-lymphatisches Gewebe und die damit verbundenen Einflüsse des umliegenden Gewebes, ob die Zellen DC- oder MΦ-Eigenschaften entwickeln (Scott *et al.* 2015, Bogunovic *et al.* 2009, Varol *et al.* 2007).

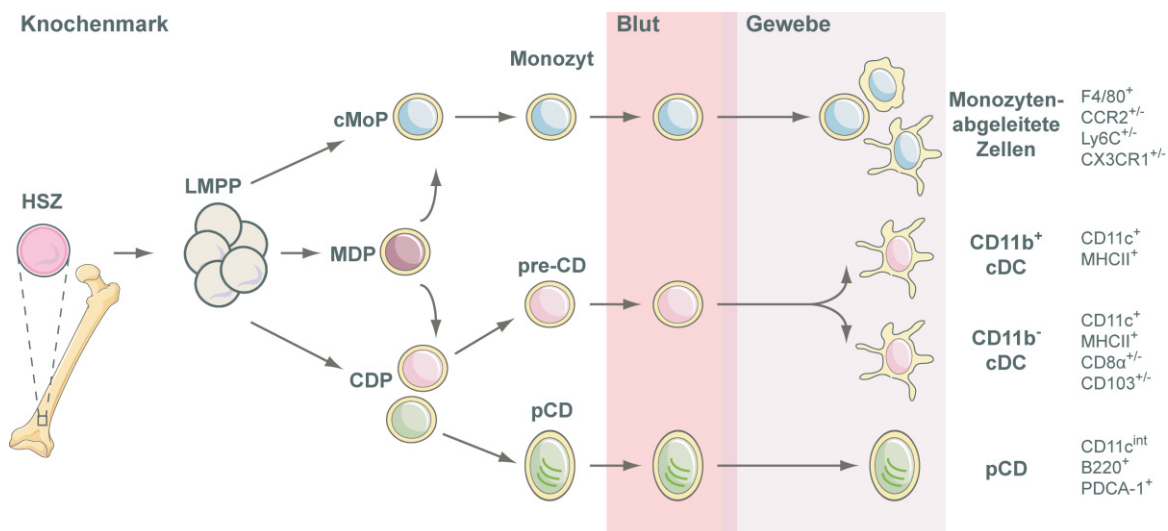


Abbildung 1: Differenzierung der DC Subpopulationen; modifiziert nach Poltorak und Schraml 2015.

Die konventionellen DCs bilden die prozentual größte Gruppe innerhalb der gesamten DC Population. Sie werden aufgrund ihrer Kurzlebigkeit kontinuierlich von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ersetzt (Geissmann *et al.* 2010, Iwasaki und Akashi 2007). Konventionelle DCs sind charakterisiert durch die Expression von CD11c und MHCII sowie dem hämatopoetischen Zellmarker CD45 und kommen in nahezu allen Geweben vor. Unter naiven Bedingungen sind die CD8⁺ cDCs vornehmlich in der T Zell Zone der Milz lokalisiert und spezialisiert auf die Cross-Präsentation von Antigenen. Die CD11b⁺ cDCs sind dagegen innerhalb der Marginalzone lokalisiert und übernehmen die Präsentation exogener Antigene an CD4⁺ T Zellen (Hildner *et al.* 2008). DCs exprimieren eine große Anzahl der Keimbahncodierten Pathogen-erkennenden Rezeptoren, wie Toll like Rezeptoren (TLRs) (Tab. 1), aber auch RIG-ähnliche Helikasen und zytoplasmatische DNA-Sensoren (Iwasaki und Medzhitov 2004). Diese induzieren nach Pathogen-induzierter Aktivierung die Reifung der DCs und die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80. Zusätzlich kommt es dadurch zur Produktion von Zytokinen wie IL-12, das die T_H1 Antwort induziert, oder IL-6, welches die T_H2 Antwort stimuliert (Hildner *et al.* 2008).

Die pDCs machen nur ungefähr 10% der gesamten DC Population aus (Asselin-Paturel *et al.* 2003). Sie sind durch eine intermediäre Expression von CD11c charakterisiert, positiv u.a. für B220, PDCA-1 und negativ für CD11b. Unter naiven Bedingungen zirkulieren pDCs hauptsächlich im peripheren Blut und sind im lymphatischen Gewebe lokalisiert. Nach Aktivierung exprimieren auch pDCs MHCII und die kostimulatorischen Moleküle CD86, CD80. Sie spielen eine zentrale Rolle in der anti-viralen Immunantwort basierend auf ihrer Funktion als professionelle Typ IFN Produzenten über TLR7 oder TLR9 induzierte Aktivierung und die konstitutive Expression des Interferon-regulierenden Faktors (IRF) 7 (Tian *et al.* 2007, Krug *et al.* 2004, Lund *et al.* 2003, Honda *et al.* 2005). So sind sie in der Lage über IFN α Sekretion die Differenzierung naiver CD4⁺ T Zellen in T_H1 Zellen zu induzieren (Sapozhnikov *et al.* 2007, Trinchieri 2003, Ito *et al.* 2002). Neben Typ I IFN produzieren pDCs aber auch weitere Zytokine wie IL-12 und den Tumornekrosefaktor (TNF) (Trinchieri 2003).

Alle DC Subpopulationen besitzen die Fähigkeit pathogene Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und über die Präsentation an naive T Zellen und/oder über

Kostimulation diese zu aktivieren (Sugamura *et al.* 2004). Sie bilden so die entscheidende Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem.

1.4 Mikroglia

Mikroglia sind ZNS residente Zellen, die oft auch als Makrophagen des ZNS bezeichnet werden. Sie exprimieren Makrophagen-assoziierte Marker wie CD11b, F4/80 und den hämatopoetischen Marker CD45. Anders als die Hauptpopulation der adulten Makrophagen, die aus fötalen Monozyten differenzieren, stammen Mikroglia von den Dottersack-Makrophagen ab. Sie entstehen aus den erythromyeloiden Vorläuferzellen (EMPs) der Dottersack Blutinseln (Abb. 2). Innerhalb des Dottersacks differenzieren diese Zellen zu CD45 exprimierenden A1 Zellen und weiter zum A2 Stadium, wobei die Expression myeloider Marker wie F4/80, CSF1R und CX3CR1 induziert wird. Die A2 Zellen wandern dann ins ZNS Mesenchym ein (ca. Tag 9,5) und differenzieren vollständig zu Mikroglia Zellen aus (Hoeffel und Ginhoux 2015, Prinz und Priller 2014, Ginhoux *et al.* 2010). Hier erneuern sie sich konstant durch Proliferation (Ajami *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu entwickeln sich postnatal die Gewebe-Makrophagen aus den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, erst zu den myeloiden Vorläuferzellen (MPs), dann zu den gemeinsamen Monozyten und DC Vorläuferzellen (MDPs). Die Monozyten reifen dann im Knochenmark vollständig aus und migrieren von dort aus ins Gewebe ein (Prinz und Priller 2014) (Abb. 2).

Naive oder „resting“ Mikroglia haben eine verästelte Gliamorphologie. Sie sind involviert in der Aufrechterhaltung der Synapsen und der Zellerneuerung im adulten ZNS, unter anderem durch die Sekretion von Neurotrophinen wie dem Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) (Tremblay *et al.* 2010, Langmann 2007). Aktivierte Mikroglia weisen eine erhöhte Expression von MHCII, CD80, CD86, CD40 und Mac-3 auf (Shrikant und Benveniste 1996, Akiyama und McGeer 1990). Auch sie funktionieren als Phagozyten und sind in der Lage Antigene an migrierte T Zellen zu präsentieren (Ford *et al.* 1996).

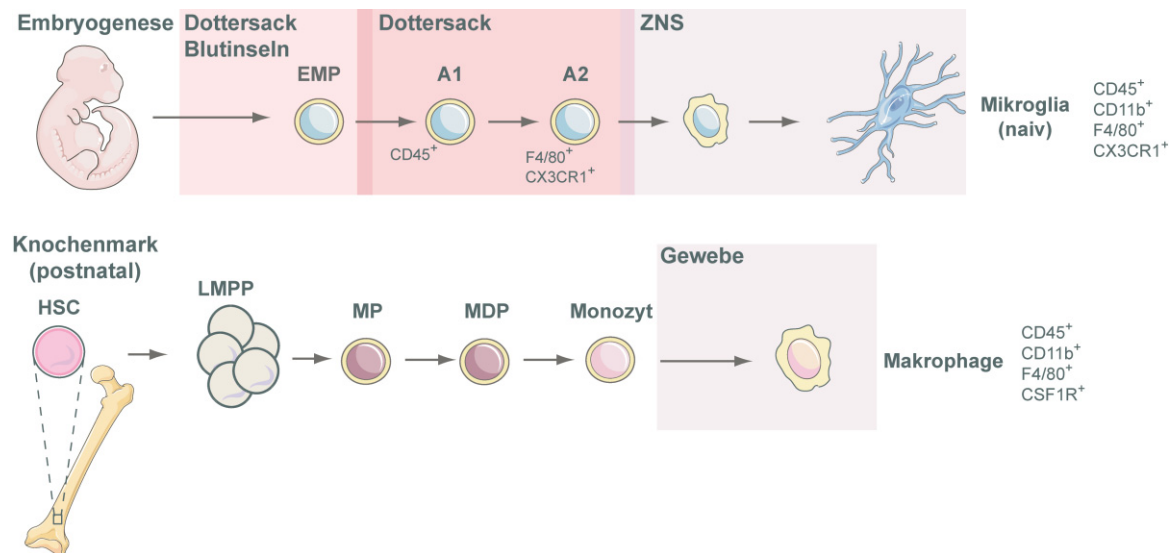


Abbildung 2: Entwicklung von Mikroglia während der Embryogenese und Makrophagen postnatal aus dem Knochenmark; modifiziert nach Prinz und Priller 2014.

Jegliche Form von Infektion, Trauma oder Ischämie, d.h. der Verlust der Homöostase induziert die Aktivierung und eine veränderte Genexpression und Funktionalität der Mikroglia (Streit *et al.* 2005, Kreutzberg 1996). Dies hat auch eine Änderung ihrer Morphologie zur Folge, die dann in eine amöboide Makrophagen-ähnliche Morphologie übergeht (Kettenmann *et al.* 2011). Aktivierte Mikroglia sekretieren Zytokine wie TNF, IL-1, Interferone und Chemokine, die der Rekrutierung von Immunzellen aus der Peripherie dienen.

1.5 Zytokine – Botenstoffe der Immunabwehr

Zytokine bilden eine Gruppe von Proteinen, die sowohl von Zellen des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems, als Antwort auf die Aktivierung durch Pathogene sekretiert werden (Janeway 1989). Sie regulieren das Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunantwort und wirken in autokriner und/oder parakriner Weise über die Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren. Die Einteilung der Zytokine erfolgt aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede in verschiedene Familien.

In dieser Arbeit stehen Typ I Interferone (vornehmlich IFN β) und Interleukin 12 im Fokus und werden im Folgenden näher beschrieben.

1.5.1 Typ I Interferone

Typ I Interferone (IFNs) sind pleiotrope Zytokine, die ursprünglich im Zusammenhang mit der viralen Interferenz beschrieben wurden (Isaacs und Lindenmann 1957). Diese Familie monomerer Zytokine besteht aus mehreren Subtypen, die von einzelnen Intron-losen Genen codiert werden. Dazu gehören das IFN β , die IFN α s (13 humane und 14 murine) und die weniger bekannten Subtypen IFN ϵ , IFN κ , IFN ω , IFN δ , IFN τ und IFN ζ in Mensch und Maus (Pestka *et al.* 2004). Alle Typ I IFNs binden an den gemeinsamen heterodimeren Typ I IFN Rezeptor (IFNAR), der nahezu auf jeder Zelle exprimiert ist. Der IFNAR besteht aus zwei Ketten, IFNAR1 und IFNAR2 (Stark *et al.* 1998). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass IFN β mit der IFNAR1 Kette einen Komplex ausbilden kann, der eine Signaltransduktion, unabhängig von der IFNAR2 Kette, ermöglicht (de Weerd *et al.* 2013). Dieser Komplex induziert die Expression verschiedener Interferon stimulierter Gene (ISGs) unabhängig vom Jak-STAT Signalweg und weist auf eine bedeutendere Rolle des IFNAR1 im Zusammenhang mit der IFN β vermittelten Immunantwort hin (de Weerd *et al.* 2013). IFN β und IFN α s regulieren oder stimulieren mehr als 2000 verschiedene Gene (Theofilopoulos *et al.* 2005) und sind damit hoch pleiotrop in ihrer Wirkung. Sie können anti-mikrobiell, anti-proliferativ und immunmodulatorisch wirken.

Besonders IFN β , zusammen mit IFN α 4, werden häufig als die initial sekretierten Zytokine im Kontext viraler Infektionen und Initiatoren des oft sogenannten antiviralen Status bezeichnet (Decker *et al.* 2005). Die Gene für IFN β und IFN α 4 (*Ifnb1* und *Ifnba4*) sind auf transkriptioneller Ebene reguliert (Honda *et al.* 2005). Der Promotor für das IFN β Gen besteht aus 4 cis-regulatorischen Elementen, den sogenannten positiven regulatorischen Domänen I-IV. Während die Domänen I und III von Mitgliedern der IRF Familie aktiviert werden, werden die Domänen II und IV von NF- κ B oder ATF-2/c-Jun aktiviert. In der Promotorregion für das IFN α 4 Gen konnten bisher nur regulatorische Domänen, die den Domänen I und III des IFN β Gens ähnlich sind und ebenfalls durch Mitglieder der IRF Familie aktiviert werden, identifiziert werden. Die Rekrutierung von ATF-2/c-Jun, IRF3 und 7 und NF- κ B zusammen mit dem Protein HMGA1 (auch HMGI(Y)) führt zur Bildung des sogenannten Enhanceosomes (Thanos *et al.* 1993). Das Enhanceosome wird von zwei Nukleosomen flankiert, die die TATA Box und den Startpunkt

der Transkription blockieren (Agalioti *et al.* 2000). Durch die Assemblierung des Enhanceasomes und die Modifikation der Nukleosomen, durch Histon-Acetyltransferasen und Chromatin-Remodelierung über den SWI/SNF Komplex, kommt es zur Repositionierung des die TATA Box blockierenden Nukleosoms, und die Transkription kann induziert werden (Lomvardas und Thanos 2001).

Typ I IFN inhibiert die virale Replikation durch die Aktivierung Zell-intrinsischer anti-viraler Faktoren, wie der Proteinkinase R (PKR), die die mikrobielle Translation inhibiert. Die IFN-induzierte 2'5' Oligoadenylat Synthetase (OAS) begünstigt die Degradation von viraler RNS und so die virale Replikation, indem es die Ribonuklease L (RNase L) aktiviert. Die ebenfalls durch IFN induzierten Mx Proteine verhindern den intrazellulären Transport viraler Partikel und somit die virale Ausbreitung (Haller und Kochs 2002). Zusätzlich fördern sie die Reifung von DCs und Phagozyten und beeinflussen direkt oder indirekt NK, T und B Zellen (Prchal *et al.* 2009).

Der Einfluss von Typ I IFNs ist nicht immer protektiv. Nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*, einem Gram-positiven Bakterium, konnte beispielsweise eine erhöhte Rate der zellvermittelten Apoptose von T Zellen und Makrophagen gezeigt werden (Stockinger *et al.* 2002, Rayamajhi *et al.* 2010).

Typ I IFNs sind auch für ihre immunmodulatorischen Effekte im Kontext der Autoimmunität bekannt (Takaoka und Yanai 2006). IFN β ist ein Standardtherapeutikum zur Behandlung der Multiplen Sklerose (Paty und Li 1993). Die immunregulatorischen Effekte werden zurückgeführt auf die Fähigkeit von IFN β , die IL-12 Produktion zu beeinflussen, T Zellen zu aktivieren und die inflammatorische T_H17 Antwort einzuschränken (Guo *et al.* 2008, Byrnes *et al.* 2001). Zudem wurde es im Zusammenhang mit der Unterdrückung von Tumorzellwachstum beschrieben (Dunn *et al.* 2005, Decker *et al.* 2005, Bogdan *et al.* 2004).

Obwohl nahezu jede Zelle die Fähigkeit IFN β/α zu exprimieren besitzt, ist die Anzahl der tatsächlichen Produzenten extrem gering (Zhao *et al.* 2012, Trinchieri *et al.* 1978). IFN β wird hauptsächlich von DCs und Makrophagen produziert (Asselin-Paturel *et al.* 2001). Als professionelle Typ I IFN Produzenten wurden die pDCs beschrieben, die nach viraler Infektion in der Lage sind große Mengen

an IFN β und α zu sekretieren (Scheu *et al.* 2008, Dalod *et al.* 2003, Fitzgerald-Bocarsly 2002).

1.5.2 Interleukin 12

Neben den Typ I IFNs werden eine Vielzahl anderer Zytokine, wie Interleukin 12 (IL-12), IL-6 oder TNF als Antwort auf eine Infektion produziert.

IL-12 ist ein 70 kDa schweres heterodimeres Zytokin der gleichnamigen Zytokinfamilie, zu der auch IL-23, IL-27 und IL-35 zählen (Vignali und Kuchroo 2012). IL-12 besteht aus zwei über Disulfidbrücken kovalent gebundenen Untereinheiten, der 35 kDa (p35) leichten und der 40kDa (p40) schweren Untereinheit. Letztere bildet in Assoziation mit der p19 Untereinheit auch das IL-23 aus (Oppmann *et al.* 2000). Ende der achtziger Jahre wurde IL-12 von Kobayashi und Kollegen als sogenannter Natürliche Killerzellen stimulierender Faktor aus einer humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie isoliert und beschrieben. Damals noch als Lymphokin bezeichnet, wurde es für seine Fähigkeit die IFN γ -Produktion zu induzieren und seine Wirkung auf die Zytotoxizität von NK Zellen und die T-Zell Antwort charakterisiert (Kobayashi *et al.* 1989). In der Zwischenzeit wurden M Φ und DCs, *in vivo* vor allem CD8⁺ cDCs, als Hauptproduzenten von IL-12 nach Aktivierung beschrieben (Reis e Sousa *et al.* 1997, Macatonia *et al.* 1995, Macatonia *et al.* 1993).

Die biologisch aktive heterodimere Form von IL-12 bindet an den ebenfalls heterodimeren IL-12 Rezeptor (IL-12R), der aus der IL-12R β 1 und IL-12R β 2 Kette besteht (Vignali und Kuchroo 2012, Presky *et al.* 1996, Chizzonite *et al.* 1992). Die p40 Untereinheit bindet mit höherer Affinität an die IL-12R β 1 Kette, während die p35 Untereinheit die β 2 Kette bindet. Exprimiert wird der Rezeptor von aktivierten T und NK Zellen, aber auch von B Zellen und DCs (Grohmann *et al.* 1998, Buchanan *et al.* 1995, Gillessen *et al.* 1995, Desai *et al.* 1992). Die Aktivierung von T Zellen über den T-Zell Rezeptor führt zu einer erhöhten Expression des IL-12 Rezeptors, bevorzugt der IL-12R β 2 Kette. Diese Expression wird durch die Produktion von IL-12 selber, aber auch durch IFN α , IFN γ , TNF oder dem kostimulatorischen Zelloberflächenmolekül CD28 gesteigert (Rogge *et al.* 1997).

Die Bindung von IL-12 an den IL-12R aktiviert die mit dem Rezeptor assoziierten Janus-Kinasen Jak2 und Tyk2 (Tyrosin-Kinase 2), was zur Aktivierung von Signal Transducer and Activator of Transcription Dimeren (STAT) 1, 3, 4 und 5 führt (Presky *et al.* 1996). Im Fall von IL-12 hauptsächlich zur Aktivierung von STAT4 (Thierfelder *et al.* 1996, Kaplan *et al.* 1996). IL-23 dagegen bindet an einen Rezeptor, der aus der IL12R β 1 Kette und der IL-23R Kette besteht. Diese Bindung führt zur Aktivierung einer ähnlichen Signalkaskade wie die Bindung von IL-12 an den IL-12R, jedoch werden hierbei andere DNS-bindende STAT Dimere induziert (Parham *et al.* 2002). Dies deutet auf unterschiedliche Funktionen beider Zytokine in der Immunantwort hin. Im Gegensatz zu IL-12 ist IL-23 weniger effizient in der Induktion von IFN γ , führt aber zur Differenzierung und Aktivierung von Gedächtniszellen (Oppmann *et al.* 2000). Weiterhin ist es für die Aktivierung von T_H17 Zellen essentiell.

IL-12 ist für die Induktion der zellvermittelten adaptiven Immunantwort von großer Bedeutung und wird nach Aktivierung von T Helferzellen (T_H Zellen) und durch IFN γ Stimulation sekretiert. Gleichzeitig stimuliert es aber auch die Differenzierung naiver T Zellen zu T_H1 Zellen und die IFN γ Produktion dieser (Trinchieri 2003, Hsieh *et al.* 1993). IFN γ und IL-12 steigern die Zytotoxizität von NK Zellen und CD8⁺ zytotoxischen T Zellen und wirken so immunmodulatorisch auf die adaptive Immunantwort.

1.5.3 Induktion von IFN β und IL-12

Virale Nukleinsäuren zählen zu den potentesten Stimuli der Typ I IFN Induktion, aber auch bakterielle und parasitäre Komponenten können diese induzieren. Sie werden über membranständige oder zytoplasmatische Rezeptoren (z.B. TLRs und RIG-I ähnliche Helikasen) des angeborenen Immunsystems gebunden. Dies führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 oder 7 und NF- κ B, deren Translokation in den Nukleus und letztendlich zur Transkription von IFN β . Das Zytokin wird von der Zelle sekretiert und bindet in auto- oder parakriner Weise an den IFNAR (Abb. 3). Diese Bindung führt zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus. Der Rezeptor ist mit Jak1 und Tyk2 assoziiert, deren Aktivierung zur Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 führt. Durch diese Phosphorylierung wird IRF9 rekrutiert und bildet zusammen mit STAT1 und

STAT2 den Interferon-stimulierten Genfaktor 3 (ISGF3), der in den Nukleus transloziert und dort an das Interferon-sensitive Antwort-Elemente (ISRE) bindet. Dadurch wird die Transkription verschiedener Interferon-stimulierter Gene aktiviert (Fu *et al.* 1990).

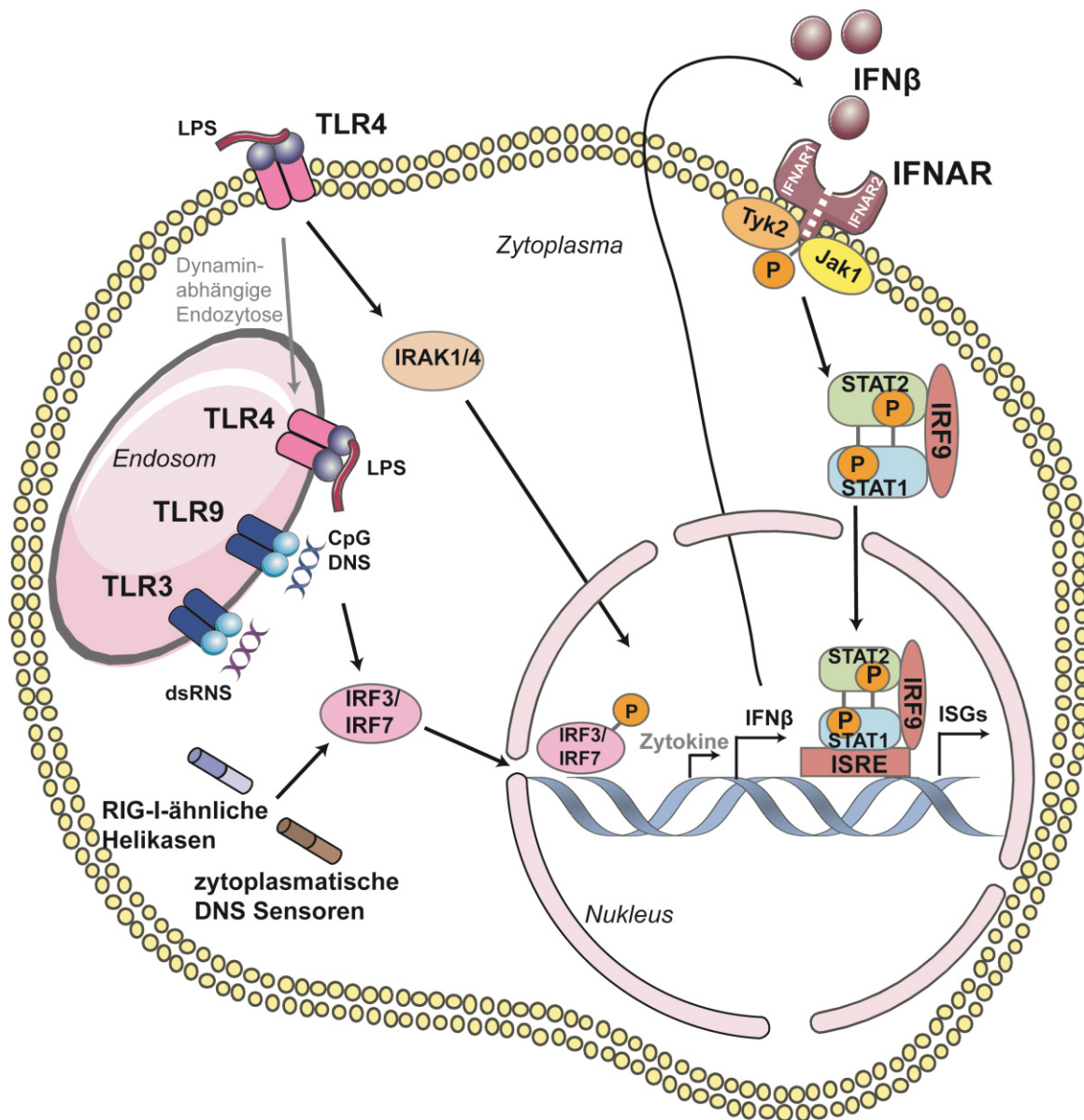


Abbildung 3: Induktion von IFN β und IL-12 und der Signalweg von IFN β über den Typ I IFN Rezeptor (IFNAR).

Die Aktivierung verschiedener PRRs wie TLR 4, 5, 7, 8 und 9 führt alternativ zur Induktion von IL-12 durch eine Aktivierung der MAP Kinase p38 (p38MAPK) und Jnk1/2 und ihrer Translokation in den Nukleus (Trinchieri 2003, Agrawal *et al.* 2003). Weitere wichtige Transkriptionsfaktoren sind das p50/c-Rel Heterodimer,

welches über NF- κ B die IL-12p40 Produktion reguliert, sowie PU.1, IRF1 und AP-1 (Trinchieri 2003, Sanjabi *et al.* 2000, Tone *et al.* 1996). Die IL-12 Produktion kann neben der Induktion über PRRs auch über die Interaktion von CD40/CD40L erfolgen. Hier spielen p38MAPK and PI3K eine zentrale Rolle (Yu *et al.* 2004).

1.5.4 Einfluss der Typ I IFN Antwort auf die IL-12 Produktion

Sowohl Typ I IFN als auch IL-12 stellen in ihrer immunregulatorischen Funktion wichtige Effektormoleküle, an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunantwort, dar. Die sich zum Teil widersprechenden Forschungsergebnisse aus verschiedenen Infektionsmodellen haben zu einem verstärkten Interesse an der Aufklärung der gegenseitigen Regulation von Typ I IFN und IL-12 in ihrer jeweiligen Expression geführt.

In seiner Funktion als immunmodulatorisches Zytokin konnte für IFN β ein negativer Effekt auf die IL-12 Produktion beschrieben werden (Gautier *et al.* 2005, Cousens *et al.* 1997). So konnte gezeigt werden, dass nach *in vitro* Stimulation mit *Staphylococcus aureus* exogen verabreichtes IFN β die IL-12 Produktion von Lymphozyten aus der Milz inhibiert. Zusätzlich konnte dieser Befund durch die Gabe von IFN β/α neutralisierenden Antikörpern nach MCMV und LCMV Infektion *in vivo* bestätigt werden (Cousens *et al.* 1997, Trinchieri und Sher 2007). Endogenes Typ I IFN kann die Aktivierung des PI3K-AKT Signalwegs hemmen, der die Expression von IL-12 verstärkt (Yen *et al.* 2015, Hasan *et al.* 2005). Gegenätzlich dazu stehen Daten, die einen stimulierenden Effekt von IFN β auf die IL-12 Produktion zeigen (Trinchieri und Sher 2007). Untersuchungen in IFNAR $^{-/-}$ und STAT1 $^{-/-}$ Mäusen zeigten eine verminderte Expression von IL-12 nach TLR Stimulation, was auf einen stimulierenden Effekt von IFN β auf die IL-12 Produktion hinweist (Gautier *et al.* 2005). Die grundlegenden Mechanismen, die die unterschiedlichen Wirkweisen der Typ I IFNs auf die Expression von IL-12 bedingen - ob stimulierend oder supprimierend - sind bis dato noch unklar. Zum einen könnte die Konzentration an IFN hier eine Rolle spielen. Während niedrige Konzentrationen an IFN eine optimale IL-12 Expression begünstigen könnten, könnten hohe Konzentrationen einen eher hemmenden Effekt besitzen.

Die aktuelle Datenlage macht weitere Untersuchungen zu einseitig- oder sogar gegenregulatorischen Effekten beider Zytokine auf ihre jeweilige Expression notwendig.

1.6 Das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV)

Das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) gehört zur Familie der Arenaviridae. Es ist ein umhülltes, negatives Einzelstrang-RNS Virus bestehend aus zwei RNS Segmenten. Diese bi-segmentierte RNS besteht aus der ca. 7,3 kb L RNS und der ca. 3,5 kb S RNS. Die L RNS kodiert die RNS-abhängige RNS-Polymerase L (250 kDa) und das Zink-Finger-bindende Protein Z (11 kDa). Die S RNS kodiert das Nukleoprotein NP (63 kDa) und das Vorläufer-Glykoprotein GP0 (ca. 75 kDa), das in die zwei Untereinheiten GP1 und GP2 gespalten wird (Welsh und Seedhom 2008, Lee *et al.* 2002).

LCMV ist ein gut etabliertes Virusmodell zur Analyse akuter und persistierender Infektionen im Kontext von z.B. MHC Restriktion und T Zell Immunität, hier besonders in T Zell-Erschöpfung (engl. exhaustion) und T Zell-Gedächtnis (engl. memory) (Zinkernagel und Doherty 1974).

Während die Stämme Armstrong und WE eine akute Infektion auslösen, die durch eine rasche und wirksame CD8 T Zellantwort innerhalb von einer Woche kontrolliert werden kann, führen die Stämme Clone 13 und Docile zu einer persistenten Infektion durch die Erschöpfung zytotoxischer CD8 T Zellen (Zhou *et al.* 2012, Wherry *et al.* 2007, Zajac *et al.* 1998).

Der natürliche Wirt des LCMV ist die Maus (*Mus musculus*), eine Replikation konnte aber auch in anderen Nagetieren, wie dem Hamster oder dem Meerschwein nachgewiesen werden, und durch seine zoonotische Eigenschaft ist es auch auf den Mensch übertragbar (Mets *et al.* 2000, Parker *et al.* 1976, Barton und Mets 1999). Hier kann es durch den Biss eines infizierten Nagetiers oder die Inhalation/Aufnahme virus-haltiger Aerosole, Urin oder Fäzes zu einer Infektion kommen. Diese verläuft in vielen Fällen asymptomatisch oder mit leichten Grippe-ähnlichen Symptomen, kann jedoch auch zur Ausbildung einer Choriomeningitis oder Meningoenzephalitis führen. Eine Infektion während der Schwangerschaft kann sich auf den ungeborenen Fötus übertragen und zu schweren Schädigungen wie Hydrozephalus, Chorioretinitis oder Mikrocephalie führen (Mets *et*

al. 2000). LCMV besitzt einen breiten Wirts- und Zelltropismus und damit eine Replikationsfähigkeit in allen Organen, lymphatischen Geweben und sogar dem ZNS (McGavern *et al.* 2002, Fazakerley *et al.* 1991).

Da es für die Behandlung von LCMV noch keine spezifisch wirksame Therapie oder einen Impfstoff gibt, erfolgt die Therapie bisher symptomatisch.

1.7 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS), auch Encephalomyelitis disseminata (ED) genannt, ist eine chronische Erkrankung, die durch die Entstehung verstreuter multipler entzündlicher Entmarkungsherde im ZNS charakterisiert ist. Diese Entmarkungsherde werden auch als Läsionen bezeichnet und entstehen vornehmlich in der weißen Substanz (Rosche *et al.* 2003). Die Ätiologie ist bisher nicht genau geklärt, es wird aber von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen (Hoffmann *et al.* 2009). Sowohl Suszeptibilitätsgene als auch Umweltfaktoren werden mit der Entstehung in Verbindung gebracht. Ein Hinweis auf Letzteres ist vor allem die hohe Prävalenz in Industrieländern (Abb. 4) (Hedstrom *et al.* 2011, Hoffjan und Akkad 2010). Weltweit gibt es schätzungsweise 1,5 bis 2,5 Millionen Patienten (Kantarci und Wingerchuk 2006). Die Betroffenen sind meist junge Erwachsene, das Prädiktionsalter liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, und Frauen sind dabei doppelt so häufig betroffen wie Männer (Boiko *et al.* 2002). Zu den bisher bestätigten Prädispositionsfaktoren zählt die Expression bestimmter Allele (DR15/DQw6) der humanen Leukozyten-Antigene (HLA) der Klasse II, die in Kaukasiern nachgewiesen werden konnten (Kantarci und Wingerchuk 2006, Olerup und Hillert 1991).

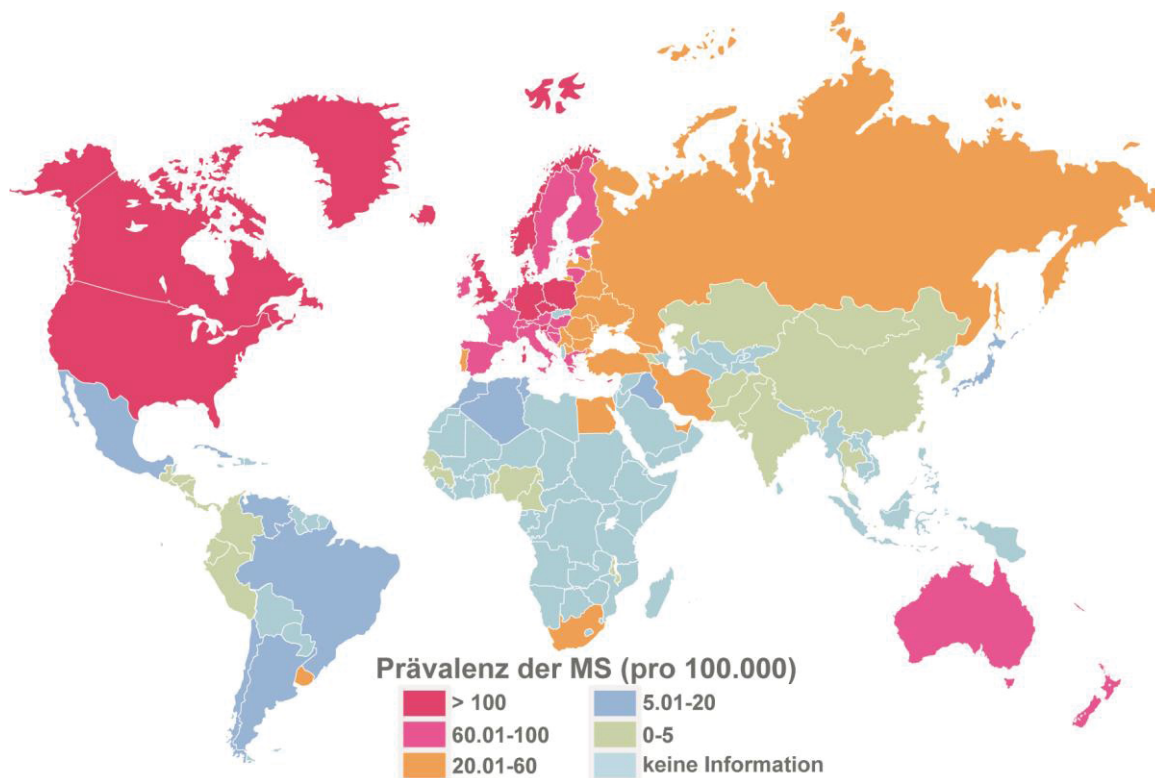


Abbildung 4: Weltweite Prävalenz der Multiplen Sklerose pro 100.000 Einwohner; modifiziert nach Hedstrom *et al.* 2011.

Neben den umweltbedingten Faktoren wie Vitamin-D-Mangel, Toxinen, Nikotin sowie physischem und psychischem Stress (Mikaeloff *et al.* 2007, Munger *et al.* 2006, Marrie 2004) und den genetischen Faktoren, steht auch der Einfluss von Infektionen als Auslöser zur Diskussion. Dabei ist vor allem das Epstein-Barr Virus von besonderem Interesse (Ascherio *et al.* 2012, Ascherio und Munch 2000). Ein Zusammenhang mit der Entstehung von MS und dem humanen Herpesvirus 6 (HHV6) oder dem Bakterium *Chlamydia pneumoniae* konnte dagegen zum Teil widerlegt werden (Swanborg *et al.* 2003, 2002, Tsai und Gilden 2001).

Der klinische Verlauf der MS wird charakterisiert durch das Auftreten der Symptome in Schüben und deren Rückbildung (Remission). Die Einteilung des klinischen Verlaufs erfolgt in vier unterschiedliche Formen: dem schubförmigen, dem schubförmig-progredienten, dem primär progredienten und dem sekundär progredienten Verlauf (Lublin und Reingold 1996). Die häufigste Verlaufsform, in etwa 70-85% der Fälle, ist die schubförmige oder schubförmig progrediente MS (relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS). Mit zunehmender Krankheitsdauer entwickeln etwa 58-89% der Patienten eine sekundär progrediente Verlaufs-

form (Tremlett *et al.* 2009). Dabei kommt es zu einer stetigen Verschlechterung der Symptome. In nur etwa 10-20% der Fälle kommt es zum schwersten, dem primär progredienten Verlauf der MS. Eine Prognose ist aufgrund der hohen Variabilität der Erkrankung kaum möglich.

1.7.1 Therapiemodelle für Multiple Sklerose

Multiple Sklerose ist bis heute unheilbar und die Therapien sind bisher auf die Milderung ihrer Symptome und die Reduktion der Schubfrequenz beschränkt. Bei den Therapiemodellen spricht man von Basis- und Eskalationstherapie. Zur Basistherapie der schubförmigen MS zählen die Behandlung mit IFN β und Glatirameracetat, einem synthetischen Tetrapeptid mit Homologie zum basischen Myelin (Johnson *et al.* 1998).

Die Eskalationstherapie kommt bei Nicht-Responsivität auf eine Basistherapie und bei der Behandlung akuter Schübe zum Einsatz. Bei einem akuten Schub werden beispielsweise hochdosierte Glukokortikoide oder Zytostatika intravenös verabreicht (Schwartzman *et al.* 2009, Rieckmann und Toyka 2002). Weitere Therapieoptionen sind die Gabe von Immunglobulinen oder immunsupprimierender Substanzen wie Mitoxantron, Azathioprin, Cyclophosphamid und Methotrexat (MTX). Zur symptomatischen Behandlung zählen die Therapie von Spastiken, Blasendysfunktion, die Schmerzbehandlung, sowie physiotherapeutische Maßnahmen.

1.7.2 Multiple Sklerose Therapie mit Interferon

Die Therapie mit Interferon ist seit Beginn der neunziger Jahre die Standardmedikation bei der RRMS. Es wird systemisch verabreicht, mildert die Schwere und verlängert die Intervalle zwischen den Schüben (Paty und Li 1993). Jedoch sind nur 70% der behandelten Patienten responsiv gegenüber dieser Therapie. Etwa 30% der mit IFN behandelten Patienten reagieren nicht auf diese Medikation, der Grund dafür ist bisher jedoch noch ungeklärt (Axtell *et al.* 2010). Einer Studie zufolge, die 1996 veröffentlicht wurde, entwickeln ca. 35% der Patienten innerhalb der ersten 18 Monate neutralisierende Antikörper, die zu vergrößerten

ZNS Läsionen und einer Erhöhung der Schubfrequenzen führen können (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group 1996).

Aktuell gehören Betaferon® und Extavia® (IFN β -1b), Avonex™ und Rebif® (IFN β -1a) und Plegridy™ (Peg-IFN β -1a) zu den interferonhaltigen Präparaten für die MS Therapie. IFN β -1b wird gentechnisch hergestellt und besitzt im Gegensatz zum IFN β -1a, das biotechnologisch hergestellt wird, keine posttranslationale Glykosylierungen. Das Peg-IFN β -1a ist pegyliert, also chemisch verbunden mit Polyethylenglykol (PEG). Der Wirkstoff wird durch diese Verbindung vor enzymatischen Abbauprozessen geschützt und kann so seine Wirkung direkt am Zielort effizient ausüben.¹

Für einige dieser Präparate konnte eine Verminderung der Schubfrequenzen um 35% und sogar eine Reduktion neuer Läsionen um bis zu 80% nachgewiesen werden (Comi *et al.* 2001, Noseworthy 1993). Trotzdem sind die Mechanismen, die zu den protektiven Effekten von IFN β führen, immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Zu den bisher vorgeschlagenen Wirkungsweisen zählen (a) die Verminderung der IFN γ -Produktion, (b) das Herunterregulieren der Matrixmetalloprotease 9 und die damit verbundene Verminderung der Gewebsschädigung und Inflammation, (c) die Hemmung der Effektorzell-Migration ins ZNS durch das Herunterregulieren des Adhäsionsmoleküls VLA-4 (very late antigen-4), (d) die Verminderung der MHC Expression auf APZs in Kombination mit der Steigerung der inhibierenden Liganden PD-L1 und PD-L2 (Programmed death-ligand), (e) die Inhibierung der T Zell Proliferation, (f) die Induktion der Apoptose in Immunzellen und (g) die Induktion von FoxA1⁺ regulatorischen T Zellen (Liu *et al.* 2014, Wiesemann *et al.* 2008, Teige *et al.* 2006, Gniadek *et al.* 2003, Nelissen *et al.* 2002, Calabresi *et al.* 1997, Pette *et al.* 1997).

¹ DMSG (2015). <http://www.dmsg.de> (Letzter Aufruf: 11.03.2016, 13:35)

1.7.3 Tiermodell der Multiplen Sklerose: Die Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Die EAE ist eines der am häufigsten angewendeten und gut charakterisierten Tiermodelle im Kontext der MS Forschung und das in dieser Dissertation verwendete Modell.

Eine EAE wird durch die Immunisierung mit Peptiden des im ZNS vorhandenen Myelin induziert. Zu diesen Peptiden zählen das basische Myelinprotein (MBP), das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und das Proteolipid-Protein (PLP). Diese Immunisierung führt zu einer autoreaktiven Immunantwort, die sich antigen-spezifisch gegen das endogene Myelin richtet. Sowohl Symptome als auch Pathologie der Erkrankung sind der MS ähnlich (Baxter 2007, Gold *et al.* 2006).

Basierend auf verschiedenen Forschungsergebnissen wird die EAE heutzutage durch die Verwendung des sogenannten kompletten Freund-Adjuvans (CFA), einer Emulsion aus Paraffinöl und abgetötetem *Mycobacterium tuberculosis*, in Verbindung mit einem Myelinpeptid induziert (Schwentker und Rivers 1934, Stuart und Krikorian 1933). Die zusätzliche Gabe von Pertussis-Toxin (PTX) aus *Bordetella pertussis* sorgt für eine Verstärkung der Immunantwort (Bernard und Carnegie 1975).

Für die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurde mit MOG₃₅₋₅₅ in CFA immunisiert.

1.7.4 Pathogenese von MS und EAE

Die Mechanismen, die für die Pathogenese von MS und EAE verantwortlich sind, konnten bisher nicht vollständig erforscht werden, da es sich um sehr komplexe und variable Prozesse handelt. In beiden Fällen liegt nach derzeitigem Wissensstand der Ursprung der Pathogenese in einer von CD4⁺ T Zellen vermittelten autoreaktiven Immunantwort gegen Bestandteile der Myelinscheide, die die neuronalen Axone umhüllt (Hemmer *et al.* 2002) (Abb. 5). Zusätzlich spielen genetische, epidemiologische und umweltbedingte Faktoren eine wichtige Rolle (Ebers *et al.* 2000, Gale und Martyn 1995, Kurtzke 1993). Die Immunreaktion gegen die

Bestandteile der Myelinscheide führt zur Demyelinisierung und folglich zu einer Neurodegeneration (Gold *et al.* 2006).

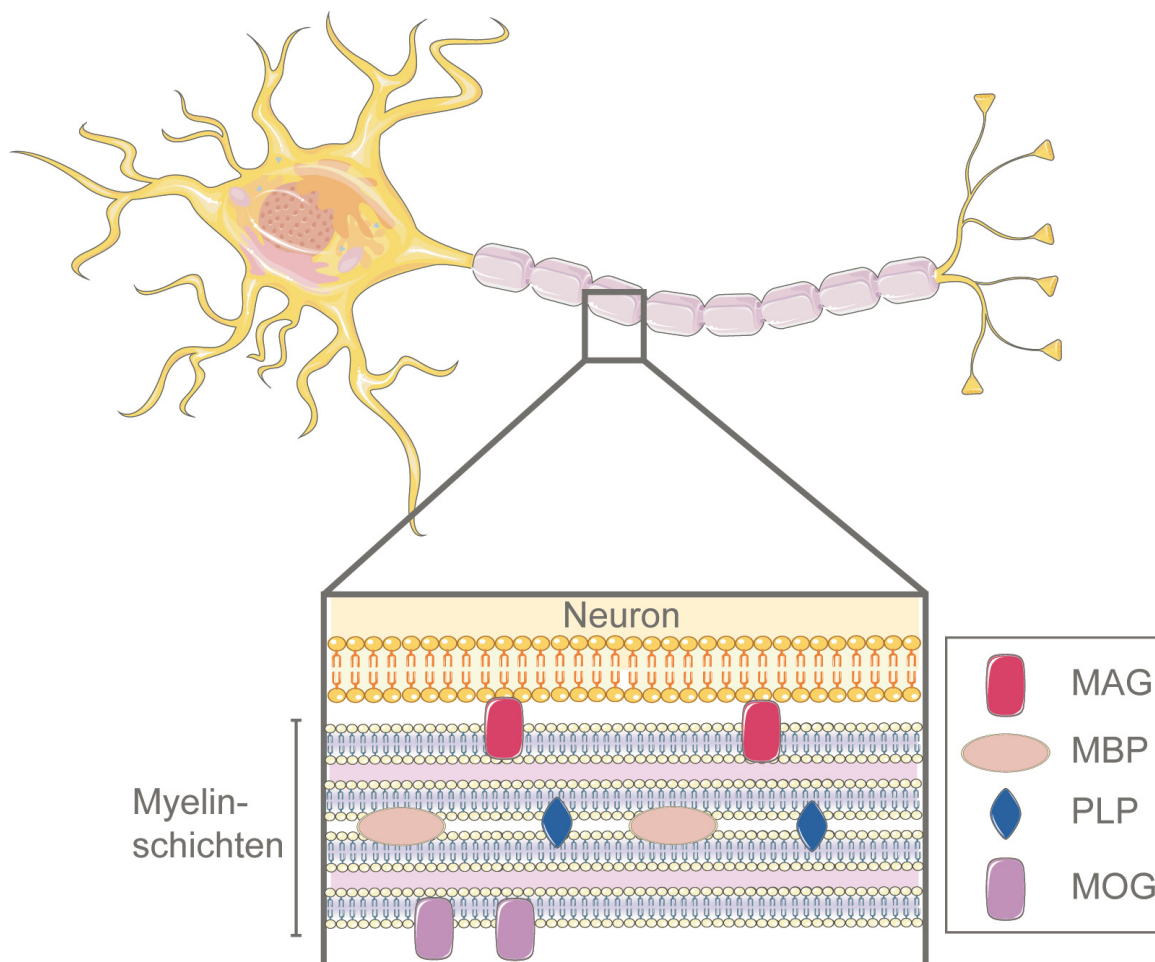


Abbildung 5: Proteine der Myelinscheide.

Zu diesen Proteinen zählen das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG), das Myelin-basische Protein (MBP), das Proteolipid-Protein (PLP) und das Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG); modifiziert nach Hemmer *et al.* 2002.

Die Aktivierung der $CD4^+$ T Helferzellen findet im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen statt und wird ausgelöst durch APZs. Der genaue Pathologie-induzierende Mechanismus für diese antigenspezifische Aktivierung ist jedoch unklar, auch weil autoreaktive T Zellen ebenfalls in gesunden Menschen nachgewiesen werden konnten (Zhang *et al.* 1994). Es wird jedoch vermutet, dass die APZs innerhalb der sekundären lymphatischen Organe auf lösliche Myelinantigene aus dem ZNS treffen, diese phagozytieren und über MHCII Moleküle an die T Helferzellen präsentieren. Die IL-17 produzierenden T_H17 Zellen migrieren dann in Abhängigkeit vom Chemokinrezeptor 6 (CCR6) in die Region

des Plexus choroideus, dessen Epithelzellen den CCR6-Liganden CCL10 konstitutiv exprimieren (Ransohoff und Engelhardt 2012, Reboldi *et al.* 2009, Villares *et al.* 2009). Mit Hilfe sogenannter Adhäsionsmoleküle lagern sich die T Zellen an das Endothel der BHS an und öffnen mittels spezifischer Enzyme die tight-junctions (Steinman 2009, Engelhardt 2006). In diesem Bereich überwinden die enzephalitogenen T_H17 Zellen die BHS und infiltrieren das ZNS. Hier treffen sie dann ein zweites Mal auf Myelin-Antigen-präsentierende Zellen, es folgt eine Reaktivierung. Diese Reaktivierung hat die Produktion proinflammatorischer Zytokine zur Folge, die nicht nur residente Mikroglia aktivieren, sondern auch die Permeabilität der BHS erhöhen und so das Eindringen weiterer Zellen aus der Peripherie begünstigen. Zu diesen Zellen gehören MΦ, DCs, zytotoxische CD8⁺ T Zellen, weitere CD4⁺ T Zellen und auch B Zellen. Der direkte Kontakt der Myelinproteine mit zytotoxischen CD8⁺ T Zellen, die eine durch Fas- und TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-vermittelte Apoptose induzieren und zytotoxische Granula sekretieren, fördert den Abbau der Myelinscheide, der die Effektorphase charakterisiert (Aktas *et al.* 2005). Die Sekretion schädigender Zytokine durch Mikroglia und MΦ und antigenspezifischer Antikörper durch B Zellen aktivieren das Komplementsystem (Archelos *et al.* 2000). Die Produktion von TNF, aber auch reaktiver Sauerstoff und Stickstoff Spezies (ROS und NOS) induzieren ebenfalls die Apoptose der Oligodendrozyten (Paintlia *et al.* 2011). Außerdem beeinflusst die ROS Produktion die Permeabilität der BHS zusätzlich und dadurch die Rekrutierung weiterer Effektorzellen. Es ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Komponenten, das letzten Endes für die Demyelinisierung und die dadurch hervorgerufene Neurodegeneration verantwortlich ist.

Im Tiermodell der EAE wird die initiale Reaktion durch die Immunisierung einer Kombination aus Myelinpeptid, CFA und PTX hervorgerufen. Durch die Injektion wird zuerst eine Antwort des angeborenen Immunsystems induziert. Die im CFA enthaltenen *M. tuberculosis* Bestandteile werden von den APZs als PAMPs erkannt, aufgenommen und prozessiert (Gonzalez-Navajas *et al.* 2010, Reynolds *et al.* 2010). Die anschließende Produktion von Zytokinen wie IL-6, IL-10, TNF und GM-CSF initiiert die adaptive Immunantwort durch Aktivierung der T_H1 und T_H17 Zellen. GM-CSF wurde als eines der Schlüsselzytokine innerhalb der EAE beschrieben und soll an der Differenzierung von T Zellen zu T_H17 Zellen beteiligt

sein (Ko *et al.* 2014). Verstärkt wird die Immunisierung vom verabreichten PTX, das durch seine irreversible Bindung an G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren die Migration von T und B Zellen in die sekundären lymphatischen Organe negativ beeinflusst. Die durch das PTX außerdem erhöhte Permeabilität der BHS ermöglicht die Infiltration verschiedener Zellen, unter anderem enzephalitogener T_H17 Zellen, ins ZNS (Korn *et al.* 2007). Die Produktion von IL-17 ist beteiligt an der Sekretion verschiedener Matrixmetalloprotease und Zytokine wie z.B. GM-CSF, die die Migration weiterer T-Zellen und myeloider Zellen in die Läsion begünstigen (Kurschus 2015).

1.8 Zielsetzung der Dissertation

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der vergleichenden Analyse immunmodulatorischer Effekte von IFN β in der ZNS Autoimmunität und dem Einfluss des Typ I IFN Signalwegs auf die IL-12 Produktion in der antiviralen Immunantwort.

IFN β als pleiotropes Zytokin übernimmt zahlreiche wichtige Funktionen im Verlauf der frühen Immunantwort und konnte bereits im Kontext verschiedener Krankheitsmodelle beschrieben werden. Durch seine Funktion als immunmodulatorisches Zytokin wirkt es aber auch auf die Produktion anderer Zytokine. Der Einfluss des IFNAR und die zugrundeliegenden Mechanismen sind dabei jedoch noch unzureichend erforscht.

Die Verwendung von Zytokin-Fluoreszenz Reportermausmodellen ermöglicht die Analyse und Charakterisierung von Zytokinproduzenten auf Einzelzellebene und bietet so die Möglichkeit einer detaillierten Aufklärung durch verschiedenen Assays. Mit Hilfe von Einzelreportermäusen für IFN β und IL-12p40 und der Kombination in einem Doppel-Reportermausmodell auf WT und IFNAR-defizienten Hintergrund soll in dieser Arbeit zum einen die Visualisierung von IFN β im Kontext der MS im EAE Tiermodell und seine Effekte auf die Immunität des ZNS untersucht werden. Zum anderen soll der Einfluss der IFN β Produktion und dem positiven IFNAR-medierten Feedback-Mechanismus auf die Produktion von IL-12 in der Immunantwort, in einem viralen Infektionsmodell und nach TLR Stimulation, *in vivo* analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
2-Methylbutan	Fluka, Ulm
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate system	Sigma, Taufkirchen
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche, Mannheim
7-Aminoactinomycin (7-AAD)	BD Pharmingen
Adjuvant complete Freund H37RA	Difco Laboratories, Detroit
Avidin/Biotin Blockierlösung	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Bovines Serum Albumin	Sigma, Taufkirchen
DEPC	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotide	Roche, Mannheim
destilliertes Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM Medium VLE	Biochrom, Berlin
DMSO	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Morphisto, Frankfurt am Main
Esel-Normal-Serum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Ethanol	Merck, Darmstadt
FACS Clean Lösung	BD Biosciences, Heidelberg

FACS Flow Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Shut Down Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
FCS	PAN, Aidenbach
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
L-Lysin	Carl Roth, Karlsruhe
Maus-Normal-Serum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RA	Difco Laboratories, Detroit
Myelin Oligodendrozyten-Glykoprotein 35-55	Biotrend, Köln
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natrium-M-Periodat	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS Chemikalienpulver	Biochrom, Berlin
PBS, 10 x, steril, für Percoll-Gradienten	Gibco, Paisly
PBS, steril, 0,5 l	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Percoll	GE Healthcare, Freiburg
Pertussis-Toxin aus <i>Bordetella pertussis</i>	Sigma, Taufkirchen
Ratten-Normal-Serum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
RNAse Zap	Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt
RPMI 1640 Medium VLE	Biochrom, Berlin

Saccharose	Serva, Heidelberg
Triton 100X	Biochrom, Berlin
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Vectashield Eindeckelmedium mit DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30 %ig	Merck, Darmstadt
Ziege-Normal-Serum	DakoCytomation, Hamburg
β -Mercaptoethanol (ME)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Anästhetika

Anästhetika	Bezugsquelle
Narketan, 100 mg/ml	Vectoquinol GmbH, Ravensburg
Xylapan, 20 mg/ml	Chassot GmbH, Ravensburg

2.1.3 Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
Collagenase Typ VIII	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I	Roche, Mannheim
SuperScript III	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA, 0,25 %	Gibco, Paisly

2.1.4 Kits und Reagenzien

Kits/Reagenzien	Bezugsquelle
BD AccuDrop Beads	BD Biosciences, Heidelberg
BD Kompensations Beads	BD Biosciences, Heidelberg
DakoCytomation Stift	DakoCytomation, Hamburg
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche, Mannheim
FastStart TaqMan Probe Master	Roche, Mannheim
Fluka RNS Isolations-Kit	Sigma-Aldirch, Taufkirchen
IFN α ELISA	eBioscience, Frankfurt am Main
IFN β ELISA	BioLegend, Fell
IFN β ELISA	pbl interferon source, Piscataway, NJ, USA
IL-12(p40) ELISA	BD Biosciences, Heidelberg
MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR [®] Assay w/ fluorescein	Eurogentec, Seraing, Belgien
rekombinantes IFN β , murin	pbl interferon source, Piscataway, NJ, USA
TissueTek [®] O.C.T. Compound	Sakura, Zoeterwoelde
TSA [™] FITC/Biotin System	Perkin Elmer, Rodgau

2.1.5 TLR Agonisten

TLR Agonisten	Bezugsquelle
CpG ODN 2216	TIB MolBiol, Berlin
LPS (<i>Samonella minnesota</i>)	List Biological Laboratories, Campbell, CA

Poly(I):Poly(C)

Amersham/GE Healthcare, Freiburg

Pam3CSK4

InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich

2.1.6 Antikörper

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Bezugsquelle
Annexin V	-	APC	BD Pharmingen
B220	Ra3-6B2	APC, PerCP, biotinyliert	BD Biosciences
CCR9	eBioCW-1.2	PE-Cy7	eBioscience
CD103	2E7	APC	BioLegend
CD11b	M1/70	APC, APC-Cy7	BD Biosciences
CD11c	HL3	APC, APC-Cy7	BD Biosciences
CD16/CD32	2.4G2	konjugiert	BioLegend
CD19	1D3	PerCP	BD Biosciences
CD3 ϵ	145-2C11	PerCP	BD Biosciences
CD45.1	A20	biotinyliert	BD Biosciences
CD45.2	104	biotinyliert	BD Biosciences
CD86	GL1	PE-Cy7	eBioscience
CD8 α	53-6.7	APC-Cy7	BD Biosciences
CD9	MZ3	biotinyliert	BioLegend
Esel anti-Hase	polyklonal	biotinyliert	Jackson Immuno Research
GFAP	polyklonal	unkonjugiert	Santa Cruz

GFP	polyklonal	unkonjugiert	Abcam
Iba-1	polyklonal	unkonjugiert	abcam
IL-12p40	C17.8	biotinyliert, PE	BD Biosciences
MBP	monoklonal	unkonjugiert	Millipore
MHCII (I-a/I-b)	M5/114	APC, biotinyliert	BD Biosciences
mPDCA-1	JF05-1C2.4.1	biotinyliert,	Miltenyi Biotec
SA-APC	-	APC	Invitrogen
SA-APC-Cy7	-	APC-Cy7	BD Biosciences
SA-Cy3	-	Cy3	Invitrogen
SA-FITC	-	FITC	BioLegend
SA-PE-Cy7	-	PE-Cy7	BD Biosciences
NFM	-	unkonjugiert	Convance Laboratories Inc

2.1.7 Oligonukleotide

Gen	Primer Sequenz	Roche-Sonde
IFN β	CAG GCA ACC TTT AAG CAT CAG CCT TTG ACC TTT CAA ATG CAG	95
ISG56	TCT AAA CAG GGC CTT GCA G GCA GAG CCC TTT TTG ATA ATG GT	6
β -Actin (nicht-reguliertes Gen)	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA CGC TCA GGA GGA GCA ATG	106

2.1.8 Zellkultur-Medien

Tabelle 2: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

	GM-CSF KMDCs	Flt3-L KMDCs	M-CSF Mikroglia	M-CSF KMMΦs	HT1080
Medium	VLE- DMEM	RPMI 1640 VLE	VLE- DMEM	RPMI 1640 VLE	RPMI 1640 VLE
Zusätze:					
stabiles L-Glutamin	0.8621 g/l	0.4459 g/l	0.8621 g/l	0.4459 g/l	0.4459 g/l
FCS	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
β-ME	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	
GM-CSF	1,5%				
Flt3-L		100 ng/ml			
M-CSF			15%	15%	
Penicillin/ Streptomycin					1%

2.1.9 Puffer

Puffer	Konzentration	Komponenten
Organverdau-Puffer	93 %	PBS 1 x
	6 %	Collagenase VIII 100 mg/ml
	1 %	DNase I 3000 U/ml
FASC-Puffer	1 x	PBS
	2 %	FCS
	2 mM	EDTA steril filtriert, entgast
MACS-Puffer	1x	PBS

	0,5%	BSA		
	2 mM	EDTA		
		steril filtriert, entgast		
PFA Fixierung, pH 7.4	1 x	PBS		
	4 %	PFA		
Stopp-Puffer	1 x	PBS		
	10 mM	EDTA		
TNB	0,1 mM	Tris-HCl, pH7,5		
	0,15 mM	NaCl		
	0,5 %	Blocking Reagenz aus TSA Kit		
PLP Fixierung, pH 7,0-7,2		in H ₂ O dd		
	1 %	PFA		
	0,075 M	L-Lysin		
	0,01 M	Natrium-M-Periodat		
Peroxidase-Puffer	1x	PBS		
	1%	H ₂ O ₂		
	0,1%	NaN ₃		
Di-basischer Puffer		in H ₂ O dd		
	0,1 M	Na ₂ HPO ₄		
Mono-basischer Puffer		in H ₂ O dd		
	0,1 M	NaH ₂ PO ₄		
Phosphatpuffer (PB)	75 %	Di-basischer Puffer		

25 %

Mono-basischer Puffer

2.1.10 Geräte

Gerät	Hersteller
Axiovert 11 Mikroskop	Zeiss
Biofuge A Zentrifuge	Heraeus
Biologische Sicherheits-Arbeitsbank	Kendro
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools
Cryotom HM 650	Thermo Fisher Scientific
Einzel- und Multikanal Pipetten	Thermo Fisher Scientific
FACS Aria II	BD, Bioscience
FACS Canto II	BD, Bioscience
Heidolph Polymax 1040 Schüttler	Heidolph Polymax 1040
Heizblock Techne DB3	Biostep
iCycler iQ5 für qRT-PCR	Bio-Rad
Konfokalmikroskop LSM510Meta	Zeiss
Millipore Elix advantage 3	Millipore
Multistep-Dispenser Handstep	Brand
NanoDrop 1000 Photometer	Peqlab
Neubauer Zytometer	LO-Laboroptik
pH Meter MP 225	Mettler-Toledo
Rotana 46 RC centrifuge	Hettich, Tuttlingen

Rotana 46 RC Zentrifuge	Hettich
TE2000 Mikroskop	Nikon
TECAN Sunrise Photometer	Tecan
Thermocycler T1	Biometra
Ultra Turrax T25	IKA
Vortex Schüttler VVR	VWR
Wasserbad	Köttermann Labortechnik
Zellkulturinkubator Heracell 20	Heraeus
CFX96 Touch™ Real-Time PCR De- tection System	BioRad

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimente

Experimentalmäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Konditionen innerhalb der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Alle Experimente, die zu Zwecken dieser Dissertation durchgeführt worden sind, wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Tierschutzgesetzes § 8 vorgenommen und vom Landesamt für Umwelt, Natur und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen zugelassen.

2.2.1.1 Experimentaltiere

Alle zum Zwecke dieser Arbeit verwendeten gentechnisch veränderten Tiere wurden mindestens fünf Generationen auf C57BL/6N Hintergrund zurückgekreuzt. Für die Infektionsexperimente wurden entweder direkte Wurfgeschwister verwendet oder die Tiere wurden vor Beginn eines Experimentes für 4-6 Wochen im sogenannten Ko-Housing gehalten.

Mauslinie	Beschreibung
C57BL/6N	Wildtyp
IFNAR1 ^{-/-}	<i>Ifnar1</i> Knockout Maus (Hwang <i>et al.</i> 1995)
IFNβ ^{-/-}	<i>Ifnb</i> Knockout Maus (Erlandsson <i>et al.</i> 1998)
IFNβ ^{mob/mob}	IFNβ Reportermaus (Scheu <i>et al.</i> 2008)
IFNAR1 ^{-/-} x IFNβ ^{mob/mob}	<i>Ifnar1</i> defiziente IFNβ Reportermaus
IL-12p40 ^{get40/get40}	IL-12p40 Reportermaus (Reinhardt <i>et al.</i> 2006)
IFNAR1 ^{-/-} x IL-12p40 ^{get40/get40}	<i>Ifnar1</i> defiziente IL-12p40 Reportermaus
IFNβ ^{mob/mob} x IL-12p40 ^{get40/get40}	IFNβ/IL-12p40 Doppel-Reportermaus
IFNAR1 ^{-/-} x IFNβ ^{mob/mob} x IL-12p40 ^{get40/get40}	<i>Ifnar1</i> defiziente IFNβ/IL-12p40 Doppel-Reportermaus
PLP-eGFP	Proteolipid-Protein Reportermaus (Sobottka <i>et al.</i> 2011)

2.2.1.2 Das IFNβ^{mob/mob} Reportermausmodell

Durch die Generierung einer Zytokin-Fluoreszenz-Reportermaus wurde eine Analyse der IFNβ Expression auf Einzelzellebene ermöglicht. Bei dieser Reportermaus handelt es sich um ein bicistronisches Knock-in System. Hier wurde eine Expressionskassette für das verbesserte gelb fluoreszierende Protein (enhanced Yellow Fluorescent Protein, eYFP) zusammen mit einer separaten internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) in den endogenen *Ifnb* Locus eingefügt. Dabei wurden sowohl das Kontrollelement für die Expression als auch das Polyadenylierungssignal des *Ifnb* erhalten, um eine Dysregulation der IFNβ Produktion zu

vermeiden. Das daraus entstandene Reporterallel trägt den Namen *mob* „messenger of interferon beta“. Das Zytokin und das Reporterprotein werden simultan exprimiert. Während das Zytokin von der Zelle sekretiert wird, akkumuliert das Reporterprotein im Zytoplasma und ermöglicht so die Visualisierung IFN β -produzierender Zellen auf Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie oder immunhistologischer Analysen (Abb. 6).

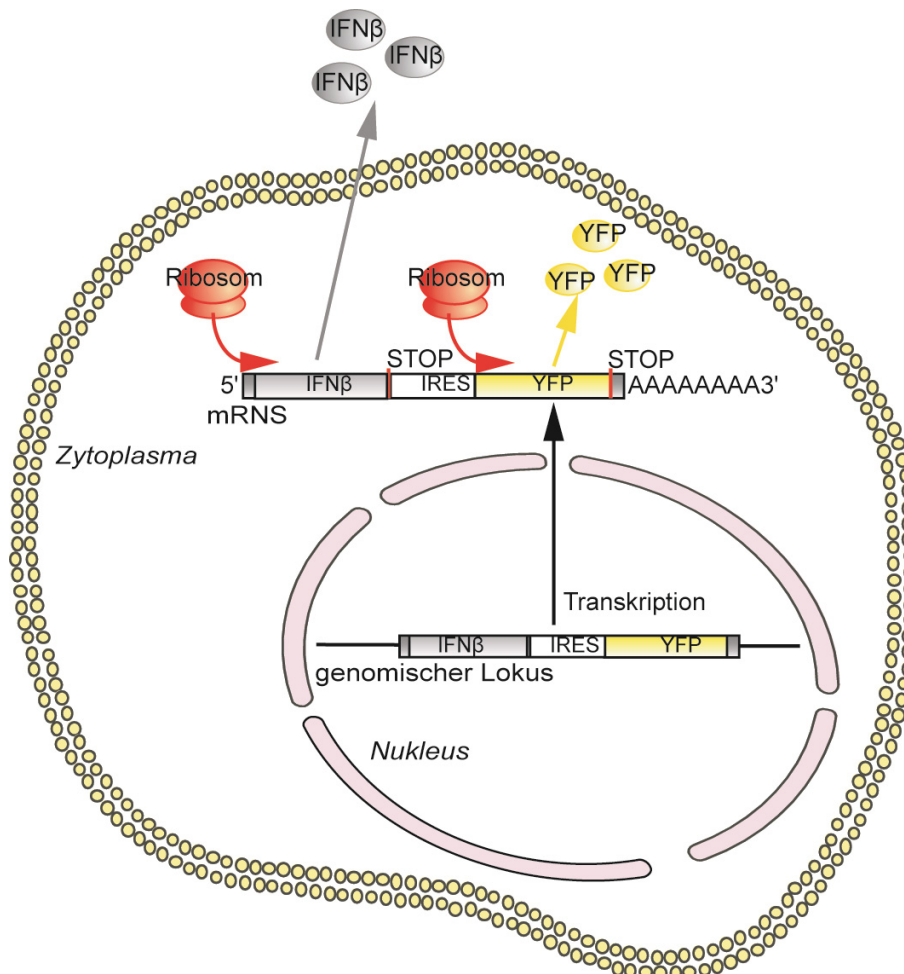


Abbildung 6: Schematische Darstellung des IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Reportermausmodell.²

² Modifiziert nach: Dresing, P. (2010). *In vitro* und *in vivo* Charakterisierung von IFN beta exprimierenden Zellen mittels eines bicistronischen Fluoreszenz-Reportermausmodells. Dissertation.

2.2.1.3 Das $\text{IFN}\beta^{\text{mob}/\text{mob}}$ x $\text{IL-12p40}^{\text{get40}/\text{get40}}$ Doppel-Reportermausmodell

Zur simultanen Visualisierung von $\text{IFN}\beta$ und IL-12 wurde die in Abschnitt 2.2.1.2 beschriebene $\text{IFN}\beta^{\text{mob}/\text{mob}}$ Reportermaus mit einer Reportermaus für IL-12p40, der $\text{IL-12p40}^{\text{get40}/\text{get40}}$ Reportermaus, gekreuzt. Dieses Mausmodell wurde analog zur mob Maus generiert, jedoch dient in diesem Fall das enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) als Reporterprotein (Reinhardt et al., 2006). Durch die Kreuzung der beiden Einzelreporter entstand ein Doppel-Reportermodell, bei dem $\text{IFN}\beta/\text{YFP}$ und IL-12/GFP simultan exprimiert werden. Wie auch bei der mob Maus werden die Zytokine von der Zelle sekretiert, während die Reporterproteine im Zytoplasma akkumulieren (Abb. 7).

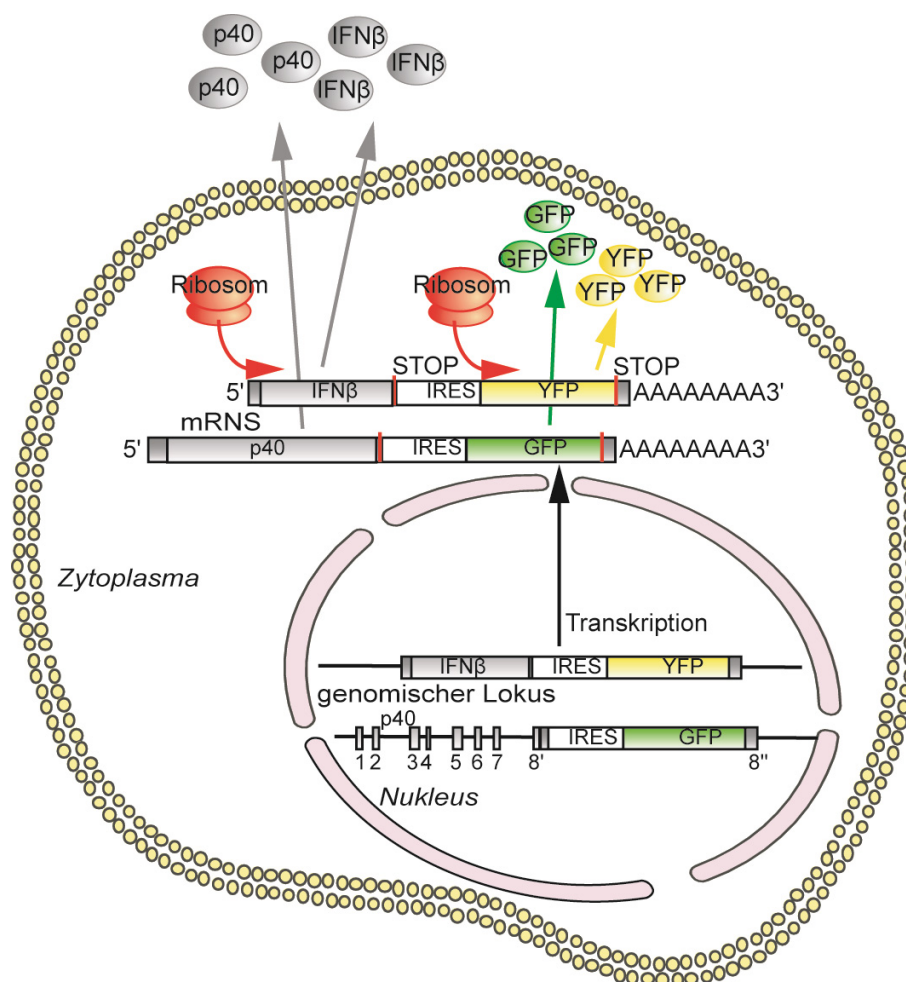


Abbildung 7: Schematische Darstellung des $\text{IFN}\beta^{\text{mob}/\text{mob}}$ x $\text{IL-12}^{\text{get40}/\text{get40}}$ Doppel-Reportermausmodell.³

³ Modifiziert nach: Dresing, P. (2010). *In vitro* und *in vivo* Charakterisierung von IFN beta exprimierenden Zellen mittels eines bicistronischen Fluoreszenz-Reportermausmodells. Dissertation.

2.2.1.4 *In vivo* Stimulation mit TLR-Agonisten

Mäuse im Alter von 7-14 Wochen wurden intravenös (i.v.) mit poly(I:C) (Polyinosin-Polycytidylsäure) oder CpG-ODN 2216 in Kombination mit dem DOTAP Transfektionsreagenz injiziert. Unmethylierte CpG-Motive enthaltende Oligodesoxynukleotide (CpG-ODNs) sind synthetische TLR 9 Liganden, beim poly(I:C) handelt es sich um ein synthetisches Analog doppelsträngiger RNS, das an den TLR 3 und die zytosolischen RNS Helikase MDA-5 bindet. Die Bindung dieser Liganden induziert die Produktion von Typ I IFN und inflammatorischen Zytokinen durch Immunzellen (DCs, MΦ oder auch B Zellen) (Kato *et al.* 2006, Alexopoulou *et al.* 2001, Hemmi *et al.* 2000). Die folgenden Konzentrationen wurden zur Stimulation der einzelnen Tiere verwendet:

- CpG2216: a) 10 µg CpG + 97 µl HBS or PBS
 b) 30 µl DOTAP + 70 µl HBS or PBS
 5 min inkubieren
 c) CpG und Transfektionsreagenzlösung mischen
 und 15 min inkubieren

- poly(I:C): 200 µg/ml in PBS
 insgesamt 300 µl Injektionsvolumen

Vor der Injektion wurden die Mäuse unter einer Infrarotlampe erwärmt. Anschließend wurde der Schwanz desinfiziert und der Stimulus mit Hilfe einer Einwegspritze und einer sterilen 30 G Kanüle i.v. injiziert.

2.2.1.5 Infektion mit LCMV

Mäuse im Alter von 8-14 Wochen wurden i.v. mit 2×10^6 PFU LCMV WE injiziert. Das Virus wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Philipp Lang vom Institut für Molekulare Medizin II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bereitgestellt.

2.2.1.6 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

In der vorliegenden Arbeit wurde die EAE mittels aktiver Immunisierung induziert. Dabei werden die Versuchstiere mit dem synthetischen enzephalitogenen Peptid des (MOG₃₅₋₅₅) in einer Emulsion mit komplettem Freundschens Adjuvans (CFA mit hitzeinaktivierten *M. tuberculosis*, 10 µg/ml) injiziert. Zur Verstärkung der Autoimmunantwort und zur Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke wurde zusätzlich Pertussis-Toxin (PTX) verabreicht.

Für die Immunisierung wurden Weibchen im Alter von 6-10 Wochen verwendet. Pro Maus wurde ein Gesamtvolumen von 200 µl aus 100 µl CFA, 40 µl MOG₃₅₋₅₅ (2 mg/ml) und 60 µl PBS verwendet. Die Emulsion wurde stets gekühlt, um eine Denaturierung des MOG-Peptids zu verhindern. Nach einer Betäubung mit Narketan und Xylapan wurden den Mäusen, mit Hilfe einer 1 ml Einwegspritze und einer 23 G Kanüle, 100 µl des Inokulums subkutan in die Schwanzbasis und jeweils 50 µl in die rechte und linke Flanke injiziert. Anschließend und nach 48 h wurden 200 ng PTX in 200 µl PBS intraperitoneal injiziert.

2.2.1.7 Evaluierung des klinischen Scores der EAE-Tiere

Der Allgemeinzustand der Versuchstiere wurde jeden Tag überprüft. Ab Tag 8-10 nach Immunisierung wurden die Tiere täglich hinsichtlich auftretender Lähmungen evaluiert und dokumentiert. Dabei wurde eine Einteilung nach folgenden Kriterien vorgenommen:

Tabelle 3: Klassifizierung des Krankheitsverlaufs der EAE.

Score	Symptom
0	keine Symptome
0,5	partielle Schwanzlähmung
1,0	vollständige Schwanzlähmung
1,5	vollständige Schwanzlähmung + unilaterale Hinterbeinlähmung
2,0	bilaterale Hinterbeinlähmung
2,5	bilaterale Hinterbeinlähmung + unilaterale Vorderbeinlähmung

3,0	bilaterale Vorderbeinlähmung
3,5	Tetraparese (Abbruchkriterium)
4,0	Tod

2.2.2 Präparation von murinen Proben

2.2.2.1 Isolation von Serum aus Vollblut

Zur Gewinnung von Serum wurde Vollblut aus der Vena submandibularis entnommen. Für die Serumseparation wurde das entnommene Vollblut für 5-10 min bei RT inkubiert und bei 14000 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und ein zweites Mal bei 14000 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Das klare Serum wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

2.2.2.2 Isolation von murinem Gewebe lymphatischer Organe

Nach zervikaler Dislokation wurden Organe wie Lymphknoten oder Milz, präpariert. Für die Herstellung von RNS-Proben wurden die Organe in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Für histologische Untersuchungen wurden die Organe wie in 2.2.2.5 beschrieben behandelt. Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die Organe in DNase I und Collagenase VIII enthaltenden Organverdau-Puffer überführt, vorsichtig mit zwei Pinzetten zerkleinert und bei 37°C für 30 min verdaut. Danach wurde der Verdau durch die Zugabe 3-5 ml Stopp-Puffer abgestoppt. Verdautes Gewebe wurde durch repetitives Auf- und Abpipettieren resuspendiert und zur Zellisolation über ein 70 oder 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 1200 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden dann wie in 2.2.2.4 beschrieben weiterbehandelt.

2.2.2.3 Isolation von murinem Gewebe aus dem ZNS

Mäuse im Alter von 7-8 Wochen wurden narkotisiert und über den rechten Herzventrikel mit 50 ml eiskaltem PBS perfundiert. Im Anschluss wurden Gehirn und Rückenmark isoliert. Für histologische Untersuchungen wurden die Organe wie in 2.2.2.5 beschrieben behandelt. Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden Rückenmark und Gehirn in einer 5 ml Petrischale zunächst mit einer Schere zerkleinert. In einer 5 ml Spritze (1/Tier) wurden 4 ml Medium und 1 ml Collagenase/Dispase (10 mg/ml) aufgezogen und durch eine 18 G Kanüle auf die zerkleinerten Organe gegeben. Die Suspension wurde anschließend mehrfach durch die Kanüle auf und ab gezogen um die Organe zu homogenisieren. Das Organhomogenat wurde zum Gewebeverdauer für 45 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 750 µl DNase I (10mg/ml) pro Organ dem Homogenat zugegeben und weitere 45 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 40 ml Mikroglia (MG)-Puffer gewaschen und die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4°C und 1200 rpm). Das Zellpellet wurde in 10 ml MG-Puffer resuspendiert und in eine neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und die Zellen erneut abzentrifugiert (10 min, 4°C und 1200 rpm).

Zur Isolierung der mononukleären Zellen wurde eine Percoll Gradient (70% zu 30%) durchgeführt. Dazu wurde das Zellpellet in 20 ml 70%igem Percoll resuspendiert und vorsichtig mit 30%igem Percoll überschichtet und bei 2130 rpm und RT für 25 min ohne Bremse (bei auslaufendem Rotor) zentrifugiert. Die oberste Schicht wurde vorsichtig abgesaugt und anschließend mit Hilfe einer Serumpipette die Interphase isoliert und über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte ein Waschschriff mit 40 ml FACS-Puffer und die Zentrifugation bei 1500 rpm, 4°C für 15 min. Zellpellets von gleichen Genotypen wurden vereinigt und ein weiteres Mal mit 40 ml FACS-Puffer und bei 1500 rpm, 4°C für 15 min zentrifugiert. Zellpellets wurden dann wie in 2.2.2.4 beschrieben weiterbehandelt.

2.2.2.4 Präparation von Organen für die Analyse mittels Durchflusszytometrie

Für die Analyse von Zellen aus Lymphknoten, Milz und ZNS wurden die Organe wie in Abschnitt 2.2.2.2 und 2.2.2.3 vorbereitet. Nach der Zellisolation wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt (nicht notwendig für Zellen aus dem ZNS). Hierzu wurden die Zellpellets in 3 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 3 min bei RT inkubiert. Abgestoppt wurde diese Reaktion durch die Zugabe von 10 ml FACS-Puffer. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellpellets in 1 ml (für die Lymphknoten), 10 ml (für die Milz) und 2 ml (für Rückenmark und Gehirn) FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Röhrchen aliquotiert und wie in 2.2.5.1 beschrieben weiterverarbeitet.

2.2.2.5 Präparation von Organen für die histologische Untersuchung

Zur Detektion von Reporterproteinen (YFP/GFP) in histologischen Schnitten wurden die Organe ü. N. in PLP-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Organe über 30%, 20% und 10%iger Sucrose Gradienten konserviert und mit PB-Puffer gewaschen. Danach wurden die Organe in mit TissueTek gefüllten Cryoformen auf Trockeneis und 2-Methylbutan eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Gewebeschnitte der Organe wurden an einem Cryotom in einer Stärke von 8 µm angefertigt und auf Objektträger gezogen. Die Aufbewahrung der Gewebeschnitte erfolgte bei -20°C.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Verwendete Zelllinien und Primärzellen

Zelltyp/Zelllinie	Beschreibung	Referenz
GM-CSF Dendritische Zellen	Isolation aus dem Knochenmark, Kultivierung in GM-CSF	(Inaba <i>et al.</i> 1992)
Flt3-Liganden Dendriti-	Isolation aus dem Knochen-	(Gilliet <i>et al.</i> 2002)

sche Zellen	mark, Kultivierung in Flt3-L	
M-CSF Mikroglia	Isolation aus dem Gehirn und Rückenmark, Kultivierung in M-CSF	(Ponomarev <i>et al.</i> 2005)
HT1080	Humane epitheliale Fibrosarkomzelllinie	DSMZ, Braunschweig; (Rasheed <i>et al.</i> 1974)
HT1080 eYFP	Humane epitheliale Fibrosarkomzelllinie mit stabiler Expression von eYFP	Prof. Dr. I. Schmitz, HZI Braunschweig
HT1080 eGFP	Humane epitheliale Fibrosarkomzelllinie mit stabiler Expression von eGFP	Prof. Dr. I. Schmitz, HZI Braunschweig

Die HT1080 Zelllinien wurden zur Kompensation der YFP und GFP Fluoreszenzen der IFN β /YFP x IL-12/GFP Doppel-Reportermaus für die Durchflusszytometrie verwendet.

2.2.3.2 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung von Zelllinien erfolgte in zellkulturbehandelten Flaschen, primäre Zellen wurden in unbehandelte Petrischalen bei 37°C und 10% CO₂ in einem befeuchteten Inkubator kultiviert. Zelllinien wurden jeden zweiten Tag oder bei Bedarf passagiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit Trypsin / EDTA für 1-2 Minuten bei 37°C inkubiert. Einzelzellsuspensionen wurden je nach Zelldichte in einem Verhältnis von 1:2, 1:3 oder 1:4 in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.3.3 Isolation myeloider Zellen aus dem murinen Knochenmark

Mäuse im Alter von 7-14 Wochen wurden nach zervikaler Dislokation fixiert und Femur und Tibia muskel- und gewebefrei isoliert. Nach der Desinfektion in 70% EtOH für 2-4 min wurden die Knochen in PBS gewaschen. Um das Knochenmark zu isolieren, wurden die Knochenenden abgetrennt und das Knochenmark, mit

Hilfe einer Einwegspritze und einer 23 G Kanüle mit Medium ohne Zusätze, in eine Petrischale gespült. Um eine Einzelzellsuspension zu generieren, wurde das Knochenmark durch repetitives Pipettieren suspendiert und über ein Zellsieb in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einer 3-minütigen Lyse der Erythrozyten bei RT mittels Erythrozyten-Lysepuffer und dem Abstoppen mit Medium, wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde zur Zellzahlbestimmung in 3 ml Medium resuspendiert. Die Knochenmarkszellen wurden anschließend in Petrischalen ausgesät und durch Zugabe von Wachstumsfaktoren zu myeloiden Zellen differenziert.

2.2.3.4 Differenzierung von Knochenmark-generierten GM-CSF DCs

Zur Differenzierung von Knochenmarkszellen in cDCs wurden 2×10^6 Zellen in 10 cm unbeschichteten Petrischalen in 10 ml GM-CSF-haltigem Medium ausgesät. An Tag 4 wurde die Kultur mit 10 ml frischem Medium ergänzt. An Tag 7 wurden 10 ml Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen abzentrifugiert (5 min, 4°C und 1200 rpm). Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Medium resuspendiert und der Kultur wieder zugeführt. Am Kulturtag 10 wurden die Zellen zur Stimulation geerntet.

2.2.3.5 Differenzierung von Knochenmark-generierten Flt3-L DCs

Zur Differenzierung von Knochenmarkszellen in eine pDC und cDC Mischkultur wurden 2×10^6 Zellen pro ml in 10 cm unbehandelten Petrischalen in 10 ml Flt3-L-haltigem Medium ausgesät. An Tag 5 wurden 5 ml des Kulturüberstands entfernt und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Medium resuspendiert und der Kultur wieder zugeführt. Am Kulturtag 8 wurden die Zellen zur Stimulation geerntet.

2.2.3.6 Isolation mononukleärer Zellen aus dem ZNS

Präparation und Isolation analog zu 2.2.2.3. Der Unterschied hier lag lediglich in der Verwendung von Medium (ohne Zusatz von M-CSF) anstelle von FACS-

Puffer, im ersten Waschschrift. Für den zweiten Waschschrift wurde Mikroglia-Medium verwendet. Im Anschluss an den letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellpellets in 2 ml Mikroglia-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in unbeschichteten 6-Well Platten ausgesät und durch Zugabe von Wachstumsfaktoren zu Mikroglia differenziert.

2.2.3.7 Differenzierung von Mikroglia aus ZNS mononukleären Zellen

Zur Differenzierung der Zellen in Mikroglia wurden die Zellen zu $1,5 \times 10^6$ / 3 ml MG-Medium und Well ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage, nach Bedarf wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden die Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert, um die adhärenen Zellen abzulösen, und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 4°C und 1200 rpm) und in frischem MG-Medium aufgenommen im Verhältnis 1:2 oder 1:4 wieder ausgesät. Am Kulturtag 14 wurden die Zellen zur Stimulation geerntet.

2.2.3.8 Stimulation und Infektion *in vitro* generierter Zellen

Die Stimulation von *in vitro* differenzierten DCs oder ZNS Mikroglia mit TLR-Agonisten erfolgte wie nachstehend aufgelistet. Die Zugabe der Stimuli erfolgte direkt in den Zellkulturüberstand. Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume stimuliert, Zeitpunkte sind den jeweiligen Experimenten zu entnehmen.

Agonist	Rezeptor	Konzentration
CpG2216	TLR9	6 µg/ml
poly(I:C)	TLR3, MDA5	50 µg/ml
LPS	TLR4	100ng/ml
Pam3CSK4	TLR2	1µg/ml
rekombinantes IFNβ	IFNAR	1, 10, 100 U/ml

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNS Isolation

RNS Isolation aus Gewebe oder Zellen wurde mittels Fluka-Kit (RNS Isolations-Kit) nach Herstellerangaben durchgeführt. RNS-Konzentrationen wurden am Nano Drop bei 260 nm ermittelt. RNS-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 cDNS Synthese

Für die cDNS-Synthese wurden bis zu 3 µg RNS eingesetzt.

Reaktionsansatz 1:

- 3 µg RNS
- 1 µl DNase I
- Add 9 µl RNase-freies Wasser

Enzymatischer Verdau zum Ausschluss von Verunreinigung durch genomische DNS erfolgte mittels DNase I für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde die DNase für 10 min bei 70°C hitzeinaktiviert.

Reaktionsansatz 2:

- 10 µl Reaktionsansatz 1
- 1 µl Oligo(dT)20 (50µM)
- 1 µl 10 mM dNTP Mix
- 1 µl RNase-freies Wasser

Reaktionsansatz 2 wurde für 5 min bei 65°C inkubiert, auf Eis gelagert und dem dritten Reaktionsansatz hinzugefügt.

Reaktionsansatz 3:

- 4 µl 5 x First Strand Buffer
- 1 µl 0,1M DTT
- 1 µl SuperscriptTM ReverseTranskriptase (200U/µl)
- 1 µl RNase-freies Wasser

Die cDNS-Synthese erfolgte nach folgendem Protokoll:

- 1 h bei 50°C inkubieren
- 15 min Inaktivierung bei 70°C

Die synthetisierte cDNS wurde anschließend 1:2 oder 1:5 für die qRT-PCR Analyse mit DEPC H₂O verdünnt und bei 4°C gelagert.

2.2.4.3 Quantitative Real Time PCR

Zur Bestimmung der relativen Genexpression mittels Fluoreszenz-markierter Sonde wurde folgender Ansatz verwendet:

- 12,5 µl Roche-Mastermix
- 6,5 µl dH₂O
- 0,5 µl Sonde
- 0,3 µl Primer 1
- 0,3 µl Primer 2

Für die Analyse wurden in einer 96 Well Platte 20 µl des Reaktions-Mastermix vorgelegt und 5 µl cDNS (1:2 oder 1:5 verdünnt) hinzugegeben. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe eines iCycler iQ5 und folgendem Protokoll durchgeführt:

- Denaturierung für 7 min bei 95°C
- 45 Zyklen á:
- Denaturierung für 20 sek bei 95°C
 - Hybridisierung und Elongation für 1 min bei 60°C
 - Anschließende Lagerung bei 4°C

Für die Bestimmung der relativen Genexpression mittels MesaGreen wurde folgender Ansatz verwendet:

- 12,5 µl 2x Mastermix (enthält MESA Green)
- 10 µl dH₂O
- 0,075 µl Primer 1
- 0,075 µl Primer 2
- 2,5 µl cDNS (1:2 oder 1:5 verdünnt)

Für die Analyse wurden in einer 96 Well Platte 22,5 µl des Reaktions-Mastermix vorgelegt und 2,5 µl cDNS (1:2 oder 1:5 verdünnt) hinzugegeben. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe eines CFX96 Touch™ Thermocycler und folgendem Protokoll durchgeführt:

- Denaturierung für 7 min bei 95°C
- 45 Zyklen á:
- Denaturierung für 20 sek bei 95°C
 - Hybridisierung und Elongation für 1 min bei 60°C
- Anschließende Lagerung bei 4°C

Für jedes Primerpaar wurde eine DNS-freie Probe als Negativkontrolle mitgeführt. Als Referenzgen für die Quantifizierung der relativen Genexpression wurde β -Actin, als nicht-reguliertes „housekeeping“ Gen, verwendet. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte nach Pfaffl (Pfaffl, 2001).

2.2.5 Immunbiologische Methoden

2.2.5.1 Extrazelluläre FACS-Färbung

Die zuvor in FACS-Röhrchen aliquotierte Zellsuspension wurde bei 1200 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Um unspezifische Antikörperbindung zu blockieren wurden 25 µl Fc-Blocklösung (α CD16/CD32, 1:100 verdünnt in FACS-Puffer) zu jeder Probe gegeben, gut gemischt (vortexen) und für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 25 µl Primärantikörper-Mixtur (1:100 verdünnt) zu den Zellen gegeben, wieder gut gemischt und weitere 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Proben durch Zugabe von 2-3 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 1200 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, falls erforderlich, wurden 50 µl Sekundärantikörper-Mixtur (1:200 verdünnt) zu den Zellen gegeben, gut gemischt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut mit 2-3 ml FACS-Puffer gewaschen, bei 1200 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde dann in 100 µl FACS-

Puffer mit DAPI (1:1000 verdünnt) resuspendiert, um lebende und tote Zellen bei der Analyse mit dem FACS Canto II voneinander diskriminieren zu können.

2.2.5.2 Präparation von Zellen für die Zellsortierung

Für die Zellsortierung wurden die Organe wie in den Abschnitten 2.2.2.2 bis 2.2.2.4 beschrieben vorbereitet. Nicht T und B Zellen wurden separiert mittels MACS Depletionssystem gegen T und B Lymphozyten. Die Depletion erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben, extrazellulär gefärbt, in 1 ml FACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert und mit dem FACS ARIA II sortiert und in FCS beschichteten FACS-Röhrchen gesammelt.

2.2.5.3 Immunhistologie

Zur histologischen Untersuchung mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden die Gewebeschnitte zunächst aufgetaut und mit einem DakoCytomation Stift umrandet. Alle Färbeschritte wurden, wenn nicht anders angegeben bei RT und in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten, wurden die Schnitte für einige Sekunden in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden zunächst für 5 min in PBS rehydriert und zur Blockierung bzw. Inaktivierung endogener Peroxidasen 20 min in Peroxidase-Puffer inkubiert. In weiteren Schritten wurden unspezifische Bindungsstellen mittels Fc-Block (1:50) und 1% Serum (abhängig von der Spezies des Sekundär-Antikörpers) in TNB für 25 min blockiert und endogenes Biotin mittels spezifischer Avidin/Biotin Blockierlösung für jeweils 20 min gebunden. Alle Primär- und Sekundär-Antikörper wurden in austrierter Konzentration in TNB für 30-60 min bei RT inkubiert. Die Färbung von YFP oder GFP wurde mit einem kreuzreagierenden polyklonalen anti-GFP Antikörper in TNB für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4°C durchgeführt. Die Fluoreszenz der Reporterproteine wurde mit Hilfe eines Tyramid-Signalverstärkungs-Kits verstärkt, die Anwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Bei Mehrfachfärbungen wurden die Peroxidase-Inaktivierung sowie der Biotin/Avidin Blockierschritt erneut durchgeführt und im Anschluss daran mit einem weiteren Marker

ko-gefärbt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit DAPI-haltigem Vectashield eingedeckt und mit Nagellack versiegelt.

2.2.5.4 ELISA

Zytokinkonzentrationen für IFN β und IL-12p40 im Serum wurden mit Hilfe eines Sandwich-ELISA durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die Serumproben, wurden nach Möglichkeit unverdünnt bzw. 1:2 verdünnt eingesetzt.

2.3 Software

Software	Verwendung
Adobe Illustrator	Erstellen von Abbildungen
Adobe Photoshop	Bildverarbeitung
FlowJo	Bearbeitung von FACS-Analysen
GraphpadPrism 5	Graphische Datendarstellung und Statistik
SoftMax Pro	Analyse von ELISA Daten
Zen 2011 blue and black edition	Bildverarbeitung und -analyse
<i>ImageJ</i>	Bildverarbeitung und -analyse

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) mittels Student-t-Test (ungepaart, zweiseitig). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM oder SD, wie in der Abbildungslegende aufgeführt. Das Signifikanzniveau ist wie folgt angegeben: * bedeutet $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,01$ und *** steht für $p < 0,001$.

2.5 Illustrationen

Die in den Abbildungen dieser Arbeit verwendeten Illustrationselemente stammen ausschließlich aus der von Servier (© 2016 LES LABORATOIRES SERVIER) zur Verfügung gestellten Medical Art Powerpoint Image Bank (www.servier.com/Powerpoint-image-bank). Servier Medical Art von Servier ist unter einer "Creative Commons Namensnennung 3.0 Unported Lizenz" lizenziert.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss von IFN β und des Typ I IFN Rezeptor Signalwegs auf die IL-12 Expression in einem Modell der antiviralen Immunantwort

IFN β wurde ursprünglich als antivirales Zytokin charakterisiert. Seine Effekte sind in diesem Zusammenhang als protektiv beschrieben, da es als das initial exprimierte Zytokin der angeborenen Immunantwort den sogenannten antiviralen Status der Zellen induziert, die Zellproliferation inhibiert und dadurch eine Virusvermehrung und Ausbreitung verhindert (Decker *et al.* 2005). Eine weitere Funktion von IFN β ist beschrieben für die Induktion der adaptiven Immunantwort und bei der Modulation anderer Zytokine wie z.B. IL-12. Zum Teil erfüllen diese beiden Zytokine aber gemeinsame regulatorischen Aufgaben und machen sie somit zu einem bedeutenden Gegenstand der Forschung. Bisher fehlte ein Experimentalsystem, welches es ermöglicht die Expression auf Einzelzellebene und simultan zu untersuchen und somit die zelluläre Quelle genauer zu charakterisieren.

Im Folgenden Teil sollen zunächst die Effekte des Typ I IFN Rezeptor Signalwegs auf die IL-12 Produktion analysiert werden. Unter Verwendung eines Doppel-Reportermausmodells für IFN β und IL-12 soll erstmals die simultane Zytokin-Produktion auf Einzelzellebene untersucht und die Zytokin-produzierenden Zellen weitergehend phänotypisch charakterisiert und innerhalb lymphatischer Organe lokalisiert werden.

3.1.1 Der Einfluss des Typ I IFN Rezeptor Signalweges auf die IL-12 Produktion im Serum nach akuter LCMV Infektion und TLR Stimulation

Für eine Infektion mit dem LCMV WE Stamm in C57BL/6 Mäusen konnte bisher gezeigt werden, dass die IL-12p70 Produktion im Serum supprimiert wird während es zu einer raschen Typ I IFN Produktion mit Höhepunkt nach 72 h kommt (Cousens *et al.* 1997, Keppler *et al.* 2012, Orange und Biron 1996). Jedoch wurde hier nur die T Zell Antwort zwischen IFNAR1^{-/-} und WT (im gesamten Kapitel 3.1 als IFNAR1^{+/+} bezeichnet) Mäusen verglichen, nicht aber die Serumwerte beider Zytokine.

Um die Produktion von IL-12p40 in IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Mäusen nach akuter LCMV Infektion zu vergleichen, wurden Tiere beider Genotypen mit 2×10^6 PFU i.v. infiziert und 48 h nach Infektion Vollblut zur Serumgewinnung entnommen. Die ELISA-Analyse der Serumproben ergab einen kaum veränderten Wert der IL-12p40 Produktion zwischen naiven und infizierten IFNAR1^{+/+} Tieren. Für die IFNAR1^{-/-} Serumproben konnte jedoch ein deutlicher Anstieg nach akuter Infektion detektiert werden, sowohl im Vergleich zu den naiven IFNAR1^{-/-} als auch zu den infizierten IFNAR^{+/+} Proben (Abb. 8a).

Die Analyse der virale Last in der Milz beider Genotypen zeigte eine deutlich höhere Anzahl in den IFNAR1^{-/-} verglichen zu den IFNAR^{+/+} Milzen ($p < 0,0031$) 48 h nach Infektion (Abb. 8b).

Im Vergleich mit den synthetischen TLR Liganden poly(I:C) (TLR3 und MDA-5) und CpG (TLR9) zeigte sich im zeitlichen Verlauf innerhalb von 24 h ein früher Anstieg (6 h post Injektion) mit nachfolgendem Rückgang der Zytokinkonzentrationen. Für poly(I:C) konnte kein Unterschied im Konzentrationsverlauf zwischen IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Serumproben detektiert werden, weder für IL-12p40 noch für IFN β (Abb. 8c, linke Graphen). Für CpG konnte eine leicht (jedoch nicht signifikant) erhöhte IL-12p40 Konzentration in den IFNAR1^{-/-} Proben gemessen werden. Für die IFN β Konzentration konnte ein signifikant höherer Wert in den IFNAR1^{+/+} Proben lediglich zum Zeitpunkt 9 h p.i. Injektion detektiert werden, während der Verlauf zu den übrigen Zeitpunkten keinen Unterschied zeigt (Abb. 8c, rechte Graphen).

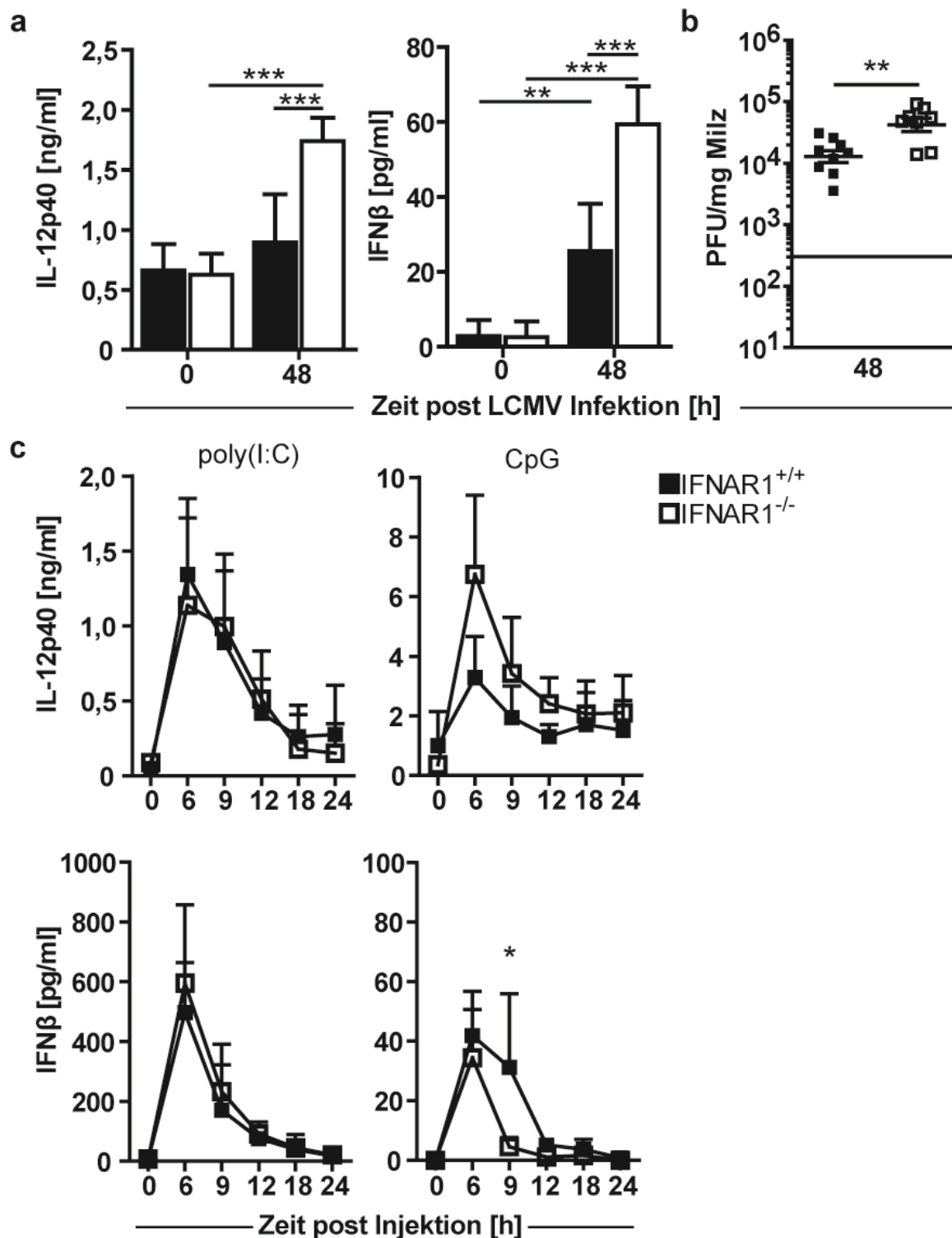


Abbildung 8: Analyse der Serumwerte von IL-12p40 und IFNβ.

IFNAR1^{+/+} (■) und IFNAR1^{-/-} (□) Mäuse wurden i.v. mit LCMV infiziert oder mit poly(I:C) oder CpG stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zytokinkonzentrationen im Serum mittels ELISA analysiert **a** Serumwerte für IL-12p40 und IFNβ nach akuter LCMV Infektion. n = 6. **b** Virale Last 48 h nach LCMV Infektion in der Milz. n = 9. Angegeben sind Mittelwert ± SEM. **c** Serumwerte für IL-12p40 und IFNβ nach poly(I:C) und CpG Stimulation. n = 3-5. Angegeben sind Mittelwert ± SD. Daten zusammengefasst aus zwei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass in einem komplexen viralen Infektionsmodell der Typ I IFN Signalweg einen supprimierenden Einfluss auf die Serumkonzentration von IL-12p40, aber auch auf die Typ I IFN Produktion selbst, hat. In weniger komplexen Systemen, wie der Stimulation mit isolierten PAMPs war dagegen eine Abhängigkeit der optimalen Typ I IFN Produktion von der Anwesenheit des IFNAR1 zu erkennen.

3.1.2 Die Lokalisation der IL-12p40 und IFN β Produzenten in der Milz nach LCMV Infektion und TLR Stimulation in IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Mäusen

Um die IL-12p40- und IFN β -produzierenden Zellen näher zu charakterisieren, wurde zunächst ihre anatomische Lage untersucht. Hierzu wurden Einzelreportermäuse (IFN β ^{mob/mob} oder IL-12p40^{get40/get40}) auf IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Hintergrund mit 2×10^6 PFU LCMV infiziert und die Milz 48 h nach Infektion immunhistologisch untersucht. Um die Lokalisation der Zellen zu bestimmen und die Anzahl der Zellen innerhalb der Milz zu quantifizieren, wurden die verschiedenen Milzareale zunächst definiert. Sie ist funktionell und anatomisch in zwei große Bereiche eingeteilt: die weiße und die rote Pulpa. Die weiße Pulpa wird weiter in die im Inneren liegende T Zell-Zone und die darum liegende B Zell-Zone eingeteilt. Die B Zell-Zone ist von der Marginalzone umgeben, die die weiße und rote Pulpa voneinander trennt (Abb. 9a) (Mebius und Kraal 2005).

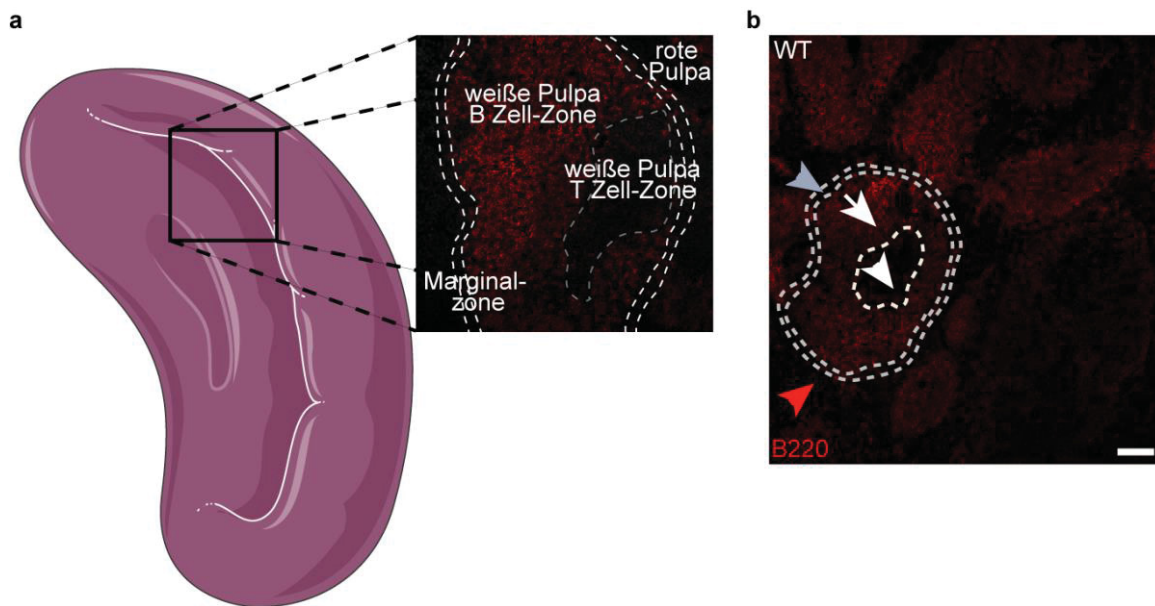


Abbildung 9: Anatomische Einteilung der Milzareale zur histologischen Auswertung.

a Definition der anatomischen Bereiche der Milz-Mikroarchitektur zur histologischen Auswertung. **b** Repräsentatives Bild für die quantitative Auswertung der Zellen innerhalb der vier definierten Milzareale. Graue Pfeilspitze: Marginalzone; weißer Pfeil B Zell-Zone der weißen Pulpa; weiße Pfeilspitze: T Zell-Zone der weißen Pulpa; rote Pfeilspitze: rote Pulpa. Gewebeschnitt einer WT Milz gefärbt mit anti-B220. Maßstab: 100 μ m.

Für die quantitative Auswertung wurden innerhalb der verschiedenen Gewebeschnitte der Milz einzelne Pulpen ausgewählt und für die Auszählung markiert. Die Auszählung der positiven Zellen erfolgte nach dem Doppelblindprinzip. In Abbildung 9b ist ein repräsentatives Bild eines WT-Kontrollschnitts ohne Reporterprotein gezeigt.

Nach viraler Infektion mit LCMV konnten beide Zytokine (IFN β und IL-12p40) innerhalb der Milz detektiert werden (Abb. 10a). Während die IFN β /YFP-produzierenden Zellen in allen Arealen der IFNAR1^{+/+} Milz nachgewiesen werden konnten, wurden die IL-12p40/GFP-produzierenden Zellen hauptsächlich in der T Zell-Zone der weißen Pulpa (77%) detektiert. Das gleiche Bild ergab sich auch in den Schnitten der IFNAR1^{-/-} Milzen, wobei hier die Verteilung der IFN β /YFP positiven Zellen noch gleichmäßiger war und die Lokalisation der IL-12p40/GFP positiven Zellen noch deutlicher auf die T Zell-Zone (82%) beschränkt schien (Abb. 10b).

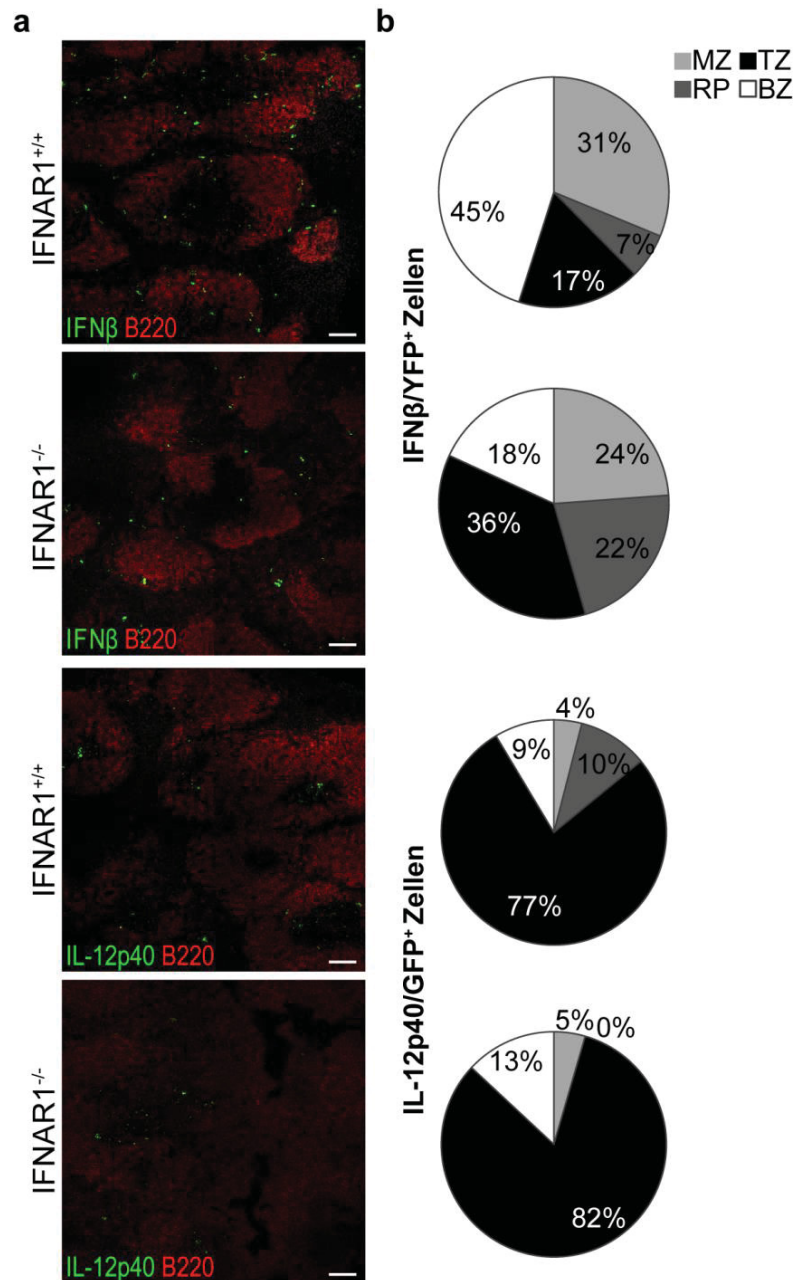


Abbildung 10: Histologische Lokalisation der IL-12p40 und IFNβ Produzenten in Gewebeschnitten der Milz nach LCMV Infektion.

IFNβ^{mob/mob} oder IL-12p40^{get40/get40} Mäuse auf IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Hintergrund wurden i.v. mit LCMV infiziert. 48 h nach Infektion wurde die Milz isoliert und für die Immunhistologie präpariert. Gewebeschnitte wurden angefärbt mit YFP kreuzreaktivem anti-GFP und anti-B220. **a** Repräsentative Bilder zur Lokalisation der Zytokinproduzenten innerhalb der Milz von IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Mäusen. Maßstab: 100 µm. **b** Prozentuale Verteilung der Zytokinproduzenten innerhalb der definierten Milzareale. MZ: Marginalzone; RP: rote Pulpa; TZ: T Zell-Zone; BZ: B Zell-Zone. n = 7-16 Pulpen. Daten zusammengefasst aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Stimulation mit den TLR Liganden poly(I:C) und CpG zeigte ebenfalls eine spezifische Lokalisation beider Zytokine (IFNβ und IL-12p40) innerhalb der Milz. Am deutlichsten war hier das Signal der IFNβ/YFP positiven Zellen innerhalb der

IFNAR1^{+/+} Milzschnitte nach poly(I:C) Stimulation. Der Vergleich von IFN β und IL-12p40 positiven Zellen in IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Milzschnitten zeigte eine IFNAR-abhängige Reduktion der Anzahl der Zytokin-produzierenden Zellen für IFN β und IL-12p40 nach poly(I:C) und eine vergleichbare Anzahl an IFN β /YFP positiven Zellen in beiden Genotypen, aber mit gesteigerter Zahl an IL-12p40/GFP positiven Zellen in IFNAR^{-/-} Mäusen nach CpG Stimulation (Abb. 11a).

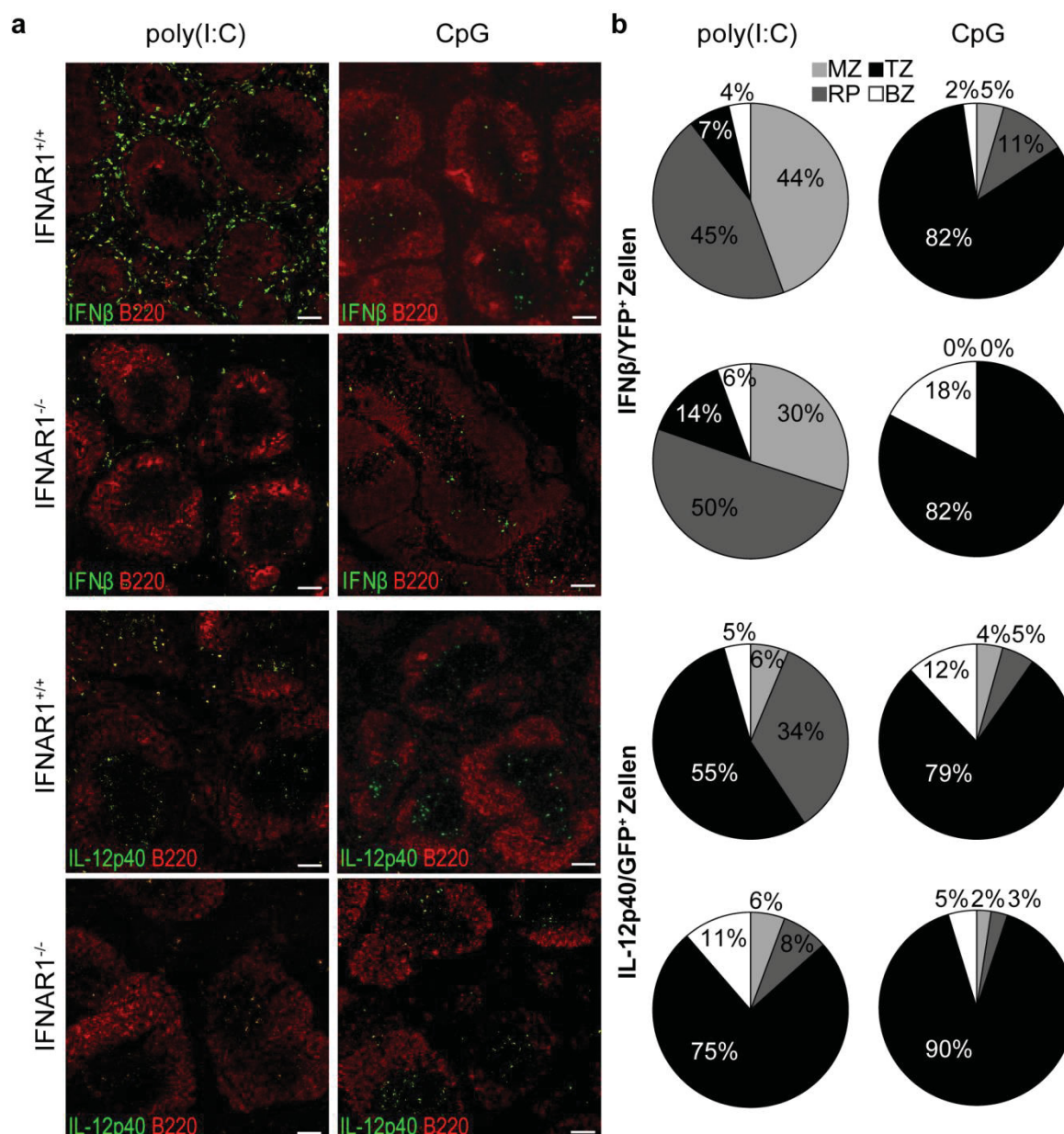


Abbildung 11: Histologische Lokalisation der IL-12p40 und IFN β Produzenten in Gewebeschnitten der Milz nach TLR Stimulation.

IFN β ^{mob/mob} oder IL-12p40^{get40/get40} Mäuse auf IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Hintergrund wurden i.v. mit poly(I:C) oder CpG stimuliert. 24 h nach Injektion wurde die Milz isoliert und für die Immunhistolo-

gie präpariert. Gewebeschnitte wurden angefärbt mit YFP kreuzreaktivem anti-GFP und anti-B220. **a** Repräsentative Bilder zur Lokalisation der Zytokinproduzenten innerhalb der Milz von IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Mäusen 24 h nach poly(I:C) (linke Spalte) oder CpG (rechte Spalte) Stimulation. Maßstab: 100 µm. **b** Prozentuale Verteilung der Zytokinproduzenten innerhalb der definierten Milzareale nach poly(I:C) (linke Spalte) oder CpG (rechte Spalte) Stimulation. MZ: Marginalzone; RP: rote Pulpa; TZ: T Zell-Zone; BZ: B Zell-Zone n = 7-16 Pulpen. Daten zusammengefasst aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die prozentuale Verteilung wies ebenfalls deutliche Unterschiede in der Lokalisation der Zytokinproduzenten auf. In IFNAR1^{+/+} Mäusen waren nach poly(I:C) Stimulation die IFNβ/YFP Produzenten hauptsächlich in der roten Pulpa (45%) und Marginalzone (44%) anzutreffen. Die IL-12p40/GFP Produzenten dagegen waren vornehmlich in der T Zell-Zone (55%), aber auch in der roten Pulpa (30%) lokalisiert. Unter IFNAR-defizienten Konditionen ging die Anzahl beider Zytokinproduzenten zurück, und die Lokalisation der Zellen beschränkte sich mit 50% der IFNβ/YFP positiven Zellen auf die rote Pulpa und 75% der IL-12p40/GFP positiven Zellen auf die T Zell-Zone (Abb. 11b, linke Diagramme). Die Verteilung der Zytokinproduzenten nach CpG ergab hingegen eine deutlich gehäufte Lokalisation beider Zytokine innerhalb der T Zell-Zone. Dieses Lokalisationsschema konnte sowohl für die IFNAR1^{+/+} (79% und 82%) als auch die IFNAR1^{-/-} Proben (82% und 90%) nachgewiesen werden (Abb. 11b, rechte Diagramme).

Sieht man sich die Verteilung der absoluten Anzahl an Zytokinproduzenten pro Pulpa an, wird die spezifische Lokalisation der Zytokin-produzierenden Zellen auf die verschiedenen Milzareale noch deutlicher. Hinzu kommen die Unterschiede in der Anzahl der Zellen in IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Milzen in bestimmten Arealen. Hier konnten zum Teil signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (Abb. 12).

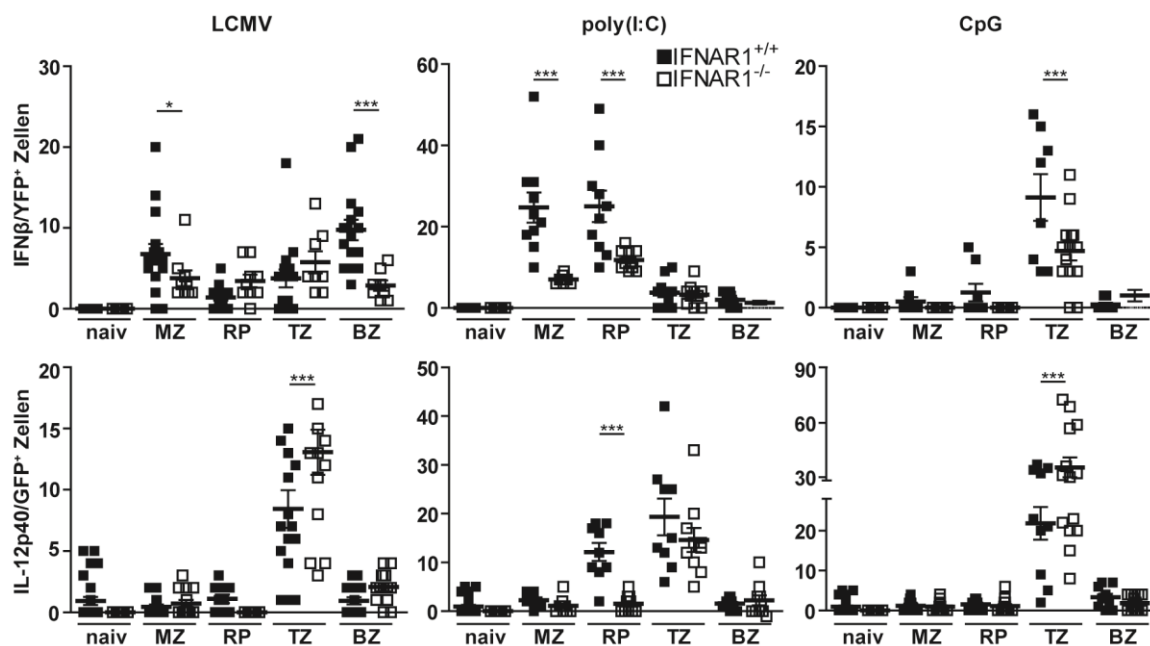


Abbildung 12: Absolute Zahl der Zytokinproduzenten innerhalb der verschiedenen Milzareale.

Auswertung der Verteilung der IL-12p40- und IFN β -exprimierenden Zellen innerhalb der Mikroarchitektur der Milz 48 h nach LCMV Infektion (links), 24 h nach poly(I:C) (Mitte) oder CpG (rechts) Stimulation. MZ: Marginalzone; RP: rote Pulpa; TZ: T Zell-Zone; BZ: B Zell-Zone n = 7-16 Pulpen. Daten zusammengefasst aus zwei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Lokalisation der IFN β und IL-12p40 Produzenten abhängig vom jeweiligen Stimulus bzw. abhängig vom jeweiligen Rezeptor-Signalweg ist. Die Lokalisation könnte ebenfalls auf unterschiedliche regulatorische Funktionen der Zytokinproduzenten innerhalb der lymphatischen Organe hinweisen.

3.1.3 Analyse der simultanen Expression von IL-12p40 und IFN β und des Einflusses des IFNAR1 auf die Zytokinproduktion mit Hilfe des IFN β ^{mob/mob} x IL-12^{get40/get40} Doppel-Reportermausmodells

Unter Verwendung eines Zytokin-Fluoreszenz-Doppel-Reportermausmodells für IFN β und IL-12 konnte die Expression beider Zytokine durchflusszytometrisch simultan nachgewiesen werden. Unter naiven Bedingungen konnte nur eine basale Expression von IL-12p40 gemessen werden, sowohl in IFNAR1^{+/+} Tieren (0,67%) als auch in IFNAR1^{-/-} Tieren (0,46%) (Abb. 13a). Nach Infektion mit LCMV und Stimulation mit poly(I:C) oder CpG konnten beide Zytokine detektiert werden. Die Mehrzahl der Zellen wies jedoch ein Expressionsmuster exklusiv für

eines der beiden Zytokine auf. Die Frequenzen der IL-12p40/GFP-exprimierenden Zellen waren unter allen Stimulationsbedingungen höher als die der IFN β /YFP-produzierenden Zellen. Nach Infektion mit LCMV konnten in IFNAR1^{+/+} Tieren 0,74% IL-12p40, 0,07% IFN β und 0,05% IL-12p40/IFN β -doppelt positive Produzenten gemessen werden. In IFNAR1^{-/-} Mäusen waren die Frequenz der IFN β Produzenten (0,01%) reduziert und die Frequenzen der IL-12p40 (0,94%) und der IL-12p40/IFN β -doppelt positiven (0,07%) Produzenten erhöht.

Nach Stimulation mit poly(I:C) konnte eine Induktion der Zytokinproduktion für IL-12p40 in 2,35%, für IFN β in 0,24% und für eine Koproduktion von IL-12p40/IFN β in 0,13% aller nicht T und B Zellen gemessen werden. In den IFNAR1^{-/-} Mäusen wurden für alle drei Populationen reduzierte Frequenzen (1,21% für IL-12p40, 0,01% für IFN β und 0,004% für IL-12p40/IFN β) gemessen.

Nach CpG Stimulation konnten Frequenzen von 2,47% IL-12p40-positiven, 0,07% IFN β -positiven und 0,18% IL-12p40/IFN β -doppelt positiven Produzenten detektiert werden. Hier konnte in IFNAR1^{-/-} Mäusen als einzige Population die IL-12p40 Expression mit einer gesteigerten Frequenz von 4,06% gemessen werden. Die IFN β (0,05%) und die doppelt positive (0,15%) Population wies auch hier reduzierte Frequenzen auf.

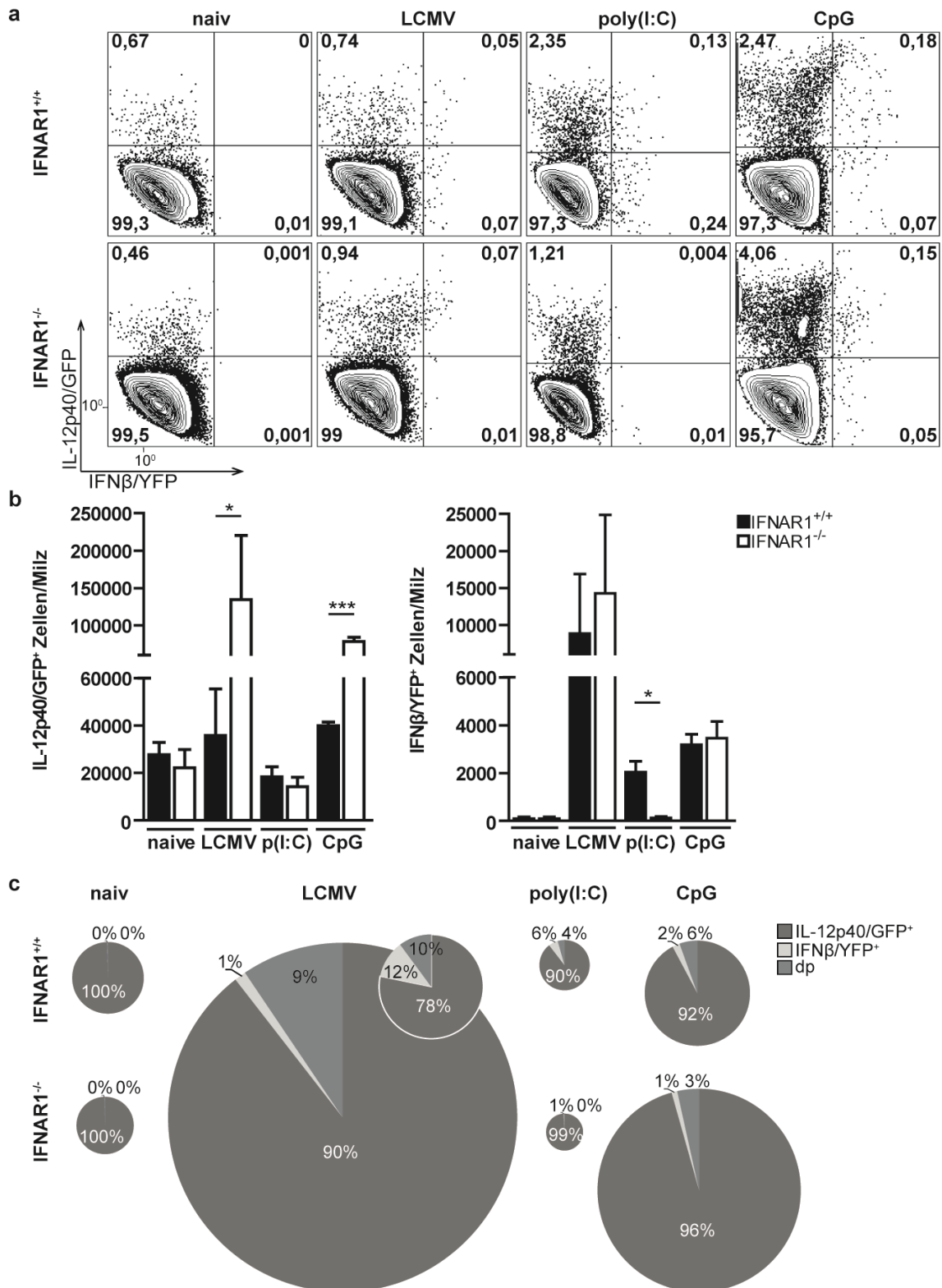


Abbildung 13: Analyse der IL-12p40 und IFN β Expression auf Einzelzellebene.

IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ x IL-12p40^{get40/get40} Mäuse auf IFNAR1^{+/+} (■) und IFNAR1^{-/-} (□) Hintergrund wurden i.v. 48 h mit LCMV infiziert oder 24 h mit poly(I:C) oder CpG stimuliert. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde die Milz entnommen und die Splenozyten isoliert. Die Analyse der Zytokinproduzenten wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die gezeigten Zellpopulationen wurden elektronisch auf lebende nicht B und T Zellen vorgegattet. **a** Durchflusszytometrische Visualisierung der IL-

IL-12p40- und IFN β -produzierenden Zellen, naiv, 48 h nach LCMV, 24 h nach poly(I:C) und 24 h nach CpG. **b** Absolute Zellzahl der IL-12p40- und IFN β -produzierenden Zellen. Zusammengefasst sind jeweils die IL-12p40 oder IFN β positiven Zellen plus die Anzahl der doppelt positiven Zellen. $n = 6$. Angegeben sind Mittelwert \pm SD. Daten zusammengefasst aus zwei unabhängigen Experimenten. **c** Prozentuale Verteilung der IL-12p40 und IFN β einzelpositiven und doppelt positiven Zellen. Die Größe der Kreisdiagramme bezieht sich auf die absolute Zellzahl aller Zytokinproduzenten wie in **b** dargestellt. dp: doppelt positiv.

Die Analyse der absoluten Zellzahlen für die Zytokin-exprimierenden Zellen bestätigte den Trend der Frequenzen größtenteils. Die IL-12p40 Expression wies nach LCMV ($p < 0,0404$) und CpG ($p < 0,0004$) eine deutliche Zunahme auf (Abb. 13b, linker Graph). Im Falle der IFN β Expression deuteten die absoluten Zahlen nach LCMV und CpG eher eine Zunahme in den IFNAR1^{-/-} Mäusen, jedoch ohne Signifikanz, an. Lediglich die Reduktion der IFN β Produktion in den IFNAR1^{-/-} Mäusen nach poly(I:C) wies ein Signifikanzniveau von $p < 0,0189$ auf und bestätigte den Trend der gemessenen Frequenzen (Abb. 13b, rechter Graph). Es gilt zu beachten, dass für die Angabe der absoluten Zellzahlen, die jeweils einzelexprimierende Zellpopulation (IL-12p40 oder IFN β) mit der doppelt positiven Population (IL-12p40/IFN β) zusammengefasst wurde.

Die prozentuale Verteilung der drei Populationen zeigte, dass die Mehrzahl der Zytokin-produzierenden Zellen ko-positiv für IL-12p40 ist, mit bis zu 99% der Gesamtzytokinproduzenten nach poly(I:C) (Abb. 13c).

Diese Daten zeigen zum ersten Mal die simultane Expression von IFN β und IL-12p40 auf Einzelzellebene und ermöglichen die Diskriminierung beider Populationen anhand ihrer Reporterproteinexpression von YFP und GFP. In weiteren Experimenten wurden die Zytokinproduzenten mit Hilfe der Doppel-Reportermaus phänotypisch charakterisiert.

3.1.4 Phänotypische Charakterisierung der IL-12p40- und IFN β -produzierenden Zellen

DCs und auch M Φ s wurden bereits als Hauptproduzenten von IL-12 und IFN β im Kontext viraler Infektionen beschrieben (Dalod *et al.* 2002, Scheu *et al.* 2008, Trinchieri 2003). Mittels unterschiedlichster Assays wurden diese Zellen untersucht, jedoch bislang nie auf die simultane Expression beider Zytokine hin und vor allem nicht auf Einzelzellebene. Um die Hauptproduzenten dieser beiden wichtigen Zytokine genauer zu charakterisieren wurde der Phänotyp dieser un-

tersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zelloberflächenmarker und ihre Koexpression mit IL-12p40/GFP oder IFN β /YFP zur Unterscheidung der Subpopulationen analysiert und die Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Hierbei wurde unterschieden zwischen CD11b⁺ CD11c⁻ Monozyten, CD11c⁺ CD11b⁺ cDCs, CD11c⁺ CD8 α ⁺ cDCs und CD11c^{int} B220⁺ mPDCA-1⁺ pDCs. Die Gesamtsplenozyten wurden zuvor auf lebende nicht T und B Zellen gegatet. Die Analyse der einzelnen Zytokin-produzierenden Populationen aufgeteilt in Monozyten und die unterschiedlichen DC Subpopulationen zeigte, dass hauptsächlich DCs IL-12 und IFN β produzieren verglichen zu den Monozyten. Dies traf auf alle getesteten Bedingungen zu (Abb. 14a-c).

Wie bereits für die Gesamtzytokinexpression gezeigt, induzierte eine Infektion mit LCMV die höchsten Level beider Zytokine, primär exprimiert von den CD8 α ⁺ cDCs und den pDCs (Abb. 14a). Für die Stimulation mit poly(I:C) konnte die CD8 α ⁺ Subpopulation der cDCs als Hauptproduzenten für beide Zytokine charakterisiert werden. Eine Stimulation mit CpG hingegen offenbarte eine IL-12p40 Produktion primär ausgehend von den CD11b⁺ cDCs und wie im Falle der LCMV Infektion, eine IFN β Expression vornehmlich durch pDCs. Während die Anzahl der IL-12p40-produzierenden Zellen nach viraler Infektion und CpG Stimulation in IFNAR1^{-/-} Mäusen erhöht war, ging die Anzahl nach poly(I:C) Stimulation in IFNAR1^{-/-} Mäusen zurück. Die Anzahl der IFN β -produzierenden Zellen hingegen zeigte nach Infektion und poly(I:C) Stimulation eine IFNAR-abhängige Expression, während nach CpG Stimulation kein Unterschied zwischen beiden Genotypen zu erkennen war (Abb. 14b).

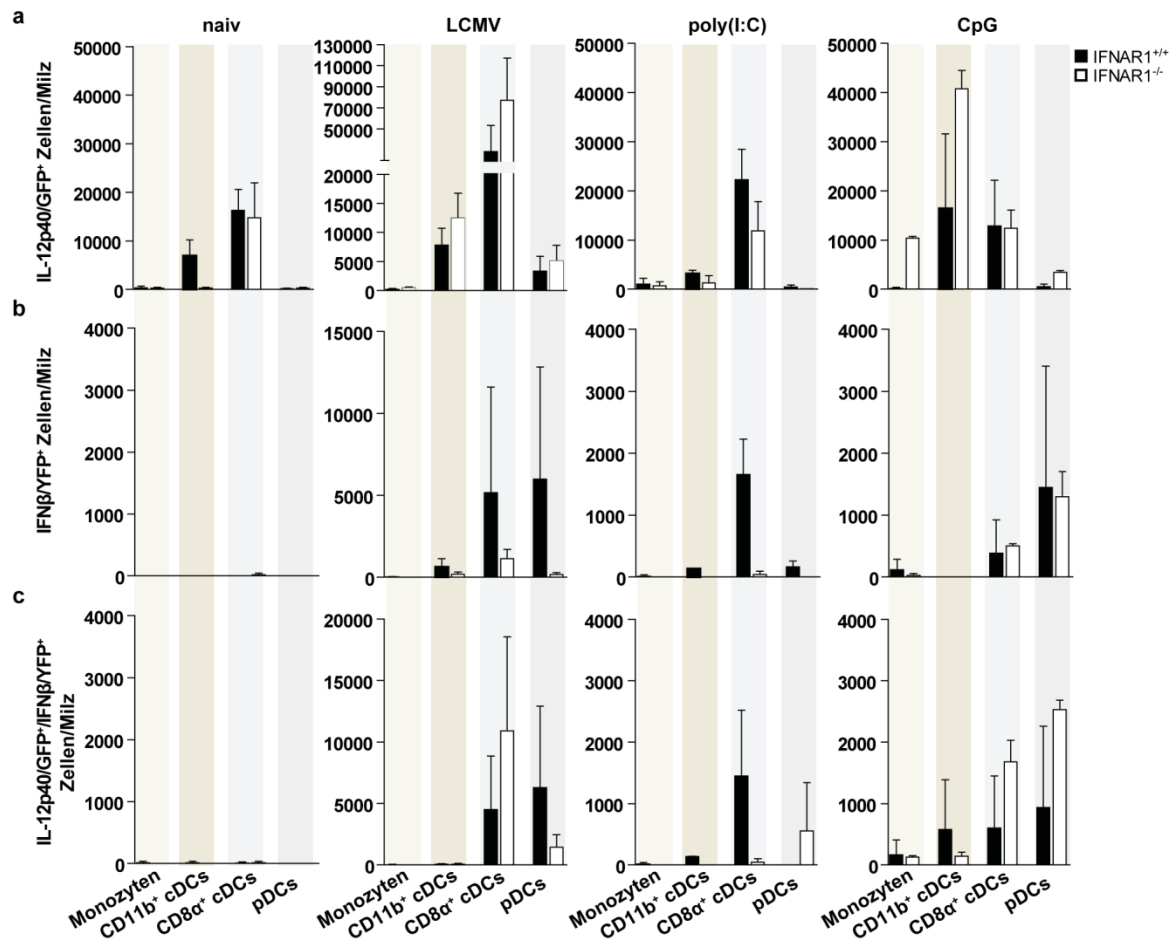


Abbildung 14: Phänotypische Charakterisierung der IL-12p40- und IFN β -produzierenden Zellen auf Einzelzellebene.

IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ x IL-12p40 $^{\text{get40/get40}}$ Mäuse auf IFNAR1 $^{+/+}$ (■) und IFNAR1 $^{-/-}$ (□) Hintergrund wurden i.v. 48 h mit LCMV infiziert oder 24 h mit poly(I:C) oder CpG stimuliert. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde die Milz entnommen und die Splenozyten isoliert. Die Analyse der Zytokinproduzenten wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die gezeigten Zellpopulationen wurden zunächst elektronisch auf lebende nicht B und T Zellen vorgegattet. Anschließend wurden sie mit Hilfe verschiedener Zelloberflächenmarker weiter charakterisiert und eingeteilt in: Monozyten, CD11b $^{+}$ cDCs, CD8 α^{+} cDCs und pDCs. Absolute Zellzahl der IL-12p40/GFP $^{+}$ (a), der IFN β /YFP $^{+}$ (b) oder doppelt positiven (c) Zellen naiv oder nach 48 h LCMV, 24 h poly(I:C) oder 24 h CpG. Angegeben sind Mittelwert \pm SD.

3.1.5 Vergleichende Analyse der Zellzahlen und Apoptoserate der Zytokinproduzenten in IFNAR1 $^{+/+}$ und IFNAR1 $^{-/-}$ Mäusen

Aufgrund der Tatsache, dass die Anzahl der Hauptzytokinproduzenten zwischen IFNAR1 $^{+/+}$ und IFNAR1 $^{-/-}$ Mäusen deutlich schwankten, wurden als nächstes die DC Subpopulationen weiter untersucht. Um genauere Einblicke in die Anzahl der DC Subpopulationen nach viraler Infektion zu bekommen, konzentrierten sich die weiteren Analysen ausschließlich auf die Infektion mit LCMV. Zunächst wurden

die prozentuale und die absolute Anzahl der cDCs und pDCs nach LCMV Infektion miteinander verglichen.

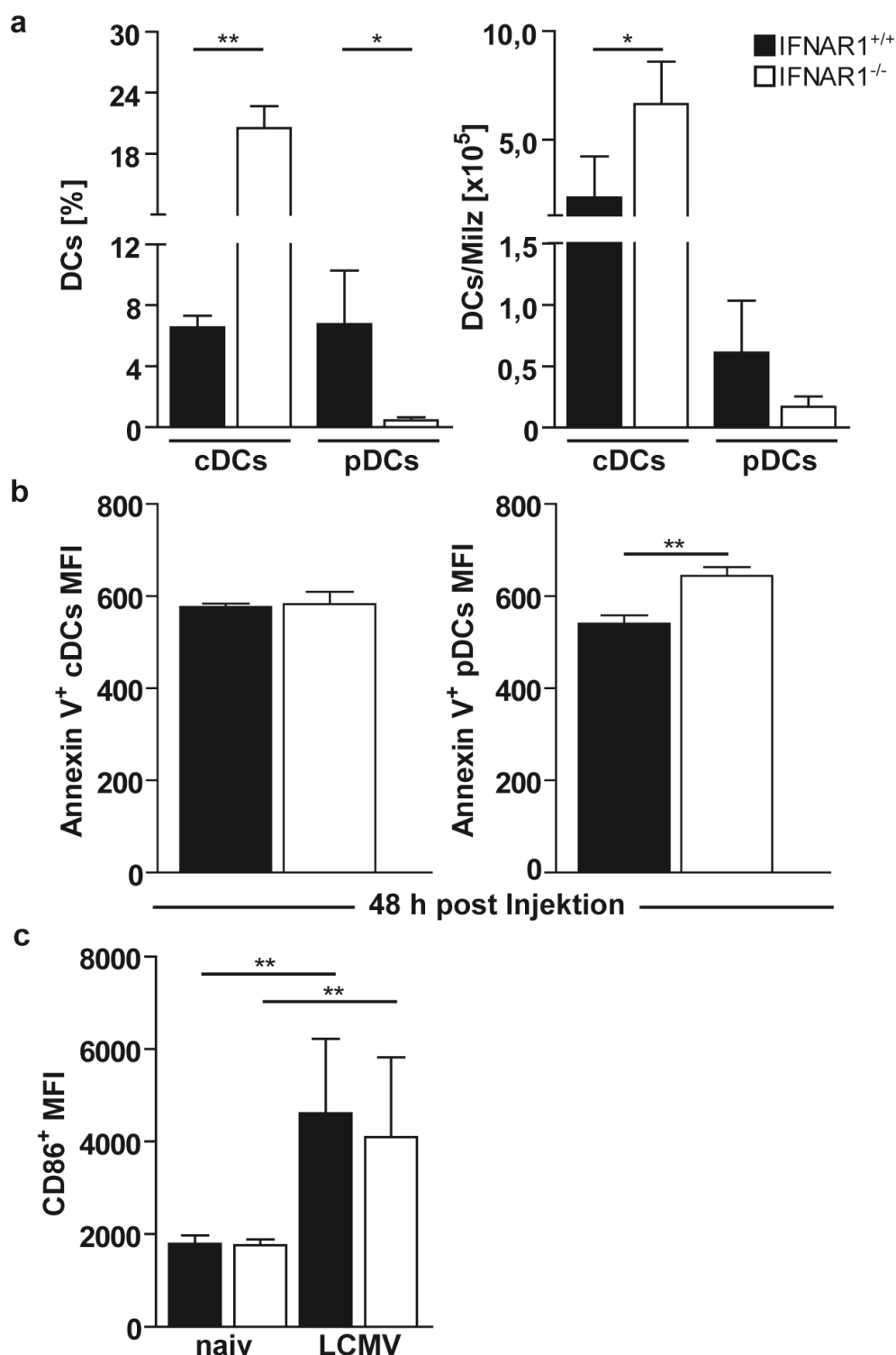


Abbildung 15: Analyse der Anzahl dendritischer Zellen in der Milz und Untersuchung der Apoptoserate dieser Zellen nach Infektion.

IFNAR1^{+/+} (■) und IFNAR1^{-/-} (□) Mäuse wurden i.v. mit LCMV infiziert. 48 h nach Infektion wurde die Milz entnommen und die Splenozyten isoliert. Die Analyse der Zellpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die gezeigten Zellpopulationen wurden zunächst elektronisch auf lebende nicht B und T Zellen vorgegattet. Anschließend wurden sie mit Hilfe CD11c, CD11b,

B220 und mPDCA-1 weiter charakterisiert und eingeteilt in: cDCs (CD11b⁺ und CD8α⁺), und pDCs (CD11b⁻ B220⁺ und mPDCA-1⁺). **a** Prozentuale (links) und absolute (rechts) Anzahl an cDCs und pDCs. n = 6. Angegeben sind Mittelwert ± SD. **b** Mittlere Fluoreszenzintensität der Annexin positiven cDCs (links) und pDCs (rechts). n = 6. Angegeben sind Mittelwert ± SD. **c** Mittlere Fluoreszenzintensität der CD86 Expression naiv und 48 h nach LCMV Infektion. n = 6. Angegeben sind Mittelwert ± SD. pl = post Infektion.

Sowohl prozentual ($p < 0,0005$) als auch absolut ($p < 0,0030$) wiesen die cDCs eine Zunahme in IFNAR1^{-/-} verglichen zu IFNAR1^{+/+} Mäusen auf, während die Anzahl der pDCs in der Knockout Situation prozentual ($p < 0,0351$) und absolut ($p < 0,0549$) reduziert war (Abb. 15a).

Diese Beobachtung führte zur Fragestellung, ob die Unterschiede in den Zellzahlen mit einer gesteigerten Apoptoserate dieser Zellen einhergehen. Im Kontext der Abwehr viraler Infektionen konnte bereits gezeigt werden, dass einige Viren in der Lage sind *in vitro* Apoptose zu induzieren und dass dieser Prozess in IFNAR1^{-/-} und STAT1^{-/-} Mäusen inhibiert war (Tanaka *et al.* 1998). Um den Einfluss des IFNAR1 auf die Apoptoserate der DCs nach LCMV Infektion zu untersuchen, wurden Splenozyten nach Infektion isoliert und die Fluoreszenzintensität von Annexin V, einem Indikator für Apoptose, durchflusszytometrisch bestimmt. Die Veränderung der Zellzahl korrelierte dabei mit der mittleren Fluoreszenzintensität an Annexin V positiven Zellen. Während bei den cDCs kein Unterschied in der Annexin V Intensität zwischen IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Proben gemessen werden konnte, zeigte die pDC Population einen deutlichen Unterschied. Hier konnte eine höhere Annexin V Intensität in den IFNAR1^{-/-} Proben gemessen werden (Abb. 15b). Diese Ergebnisse weisen auf eine erhöhte Apoptoserate der pDCs nach LCMV Infektion hin.

Interessanterweise, konnte kein Unterschied im Aktivierungsstatus der Zellen von WT und Knockout Tieren, analysiert über die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86, gemessen werden (Abb. 15c). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Infektion keinen Einfluss auf die generelle Aktivierbarkeit der Zellen hat. Es bleibt die Frage offen, ob dies auch auf die Funktion der Zellen zutrifft.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass die Serumspiegel von IL-12 in IFNAR1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu IFNAR1^{+/+} Mäusen nach einer akuten Infektion mit LCMV deutlich erhöht waren und dies einherging mit erhöhten viralen Titern in den Knockout-Mäusen. Die Hauptproduzenten der IFNβ und IL-12 Expression konnten mit Hilfe eines Zytokin-Fluoreszenz-Doppel-

Reportermausmodells, nach Aktivierung verschiedener TLR-Stimulationswege, simultan und auf Einzelzelleben detektiert und phänotypisch als Subpopulationen dendritischer Zellen charakterisiert werden. Diese IL-12p40 und IFN β Produzenten lokalisieren innerhalb verschiedener Areale in der Milz. Zusätzlich konnten unterschiedliche Effekte des Typ I IFN Rezeptor Signalwegs auf die IL-12 Produktion analysiert werden. Diese Effekte waren abhängig von der Art der Stimulation, virale Infektion oder synthetische Stimulation, und vom Zelltyp als Quelle der Zytokinexpression.

3.2 Visualisierung von IFN β und die Analyse immunmodulatorischer Effekte im Kontext von ZNS Immunität

Nicht nur in der Immunabwehr gegen Viren und andere Pathogene stellt IFN β einen wichtigen Faktor immunregulatorischer Prozesse dar. Der Einsatz von IFN β als eines der Standardtherapeutika bei der schubförmigen MS und sein Einfluss auf den Verlauf der klinischen Symptome im EAE-Tiermodell machen es, zusätzlich zu seiner Rolle in der anti-mikrobiellen Immunabwehr, zu einem wichtigen Gegenstand der Forschung inflammatorischer Reaktionen im ZNS. Trotz der bereits bekannten Effekte von IFN β sind der Mechanismus und die zelluläre Quelle von IFN β noch nicht vollständig erforscht. Während dieser Dissertation konnten mit Hilfe eines IFN β -Fluoreszenz-Reportermausmodells eine Subpopulation aktivierter Mikroglia als Hauptproduzenten von IFN β im Kontext von ZNS Inflammation identifiziert werden. Diese IFN β Produzenten lokalisieren innerhalb aktiver Läsionen im ZNS und vermitteln die Phagozytose und den Abbau von degradiertem Myelin *in vitro* und *ex vivo* in organotypischen zerebellären Schnittkulturen (OSCs).

Diese Daten wurden im März 2015, als Publikation mit geteilter Erstautorenschaft, unter dem Titel „IFN β secreted by microglia mediates clearance of myelin debris in CNS autoimmunity“ bei *Acta Neuropathologica Communications* veröffentlicht (Kocur, Schneider, Pulm *et al.* 2015).

3.2.1 Charakterisierung der zellulären Quelle von IFN β während der EAE

Es konnte bereits gezeigt werden, dass IFN β einen protektiven Effekt auf den Krankheitsverlauf im EAE-Tiermodell hat und dass IFN β am Höhepunkt der EAE im ZNS exprimiert wird (Teige *et al.* 2003, Prinz *et al.* 2008). Jedoch wurde weder der Vergleich zwischen Peripherie und ZNS noch der zeitliche Verlauf oder die zelluläre Quelle der IFN β Expression in der EAE bisher beschrieben.

In einer vergleichenden Zeitverlaufsstudie zwischen Peripherie (hier die Milz) und ZNS (hier das Rückenmark) aus MOG-immunisierten Tieren wurde daher zunächst die Expression von IFN β mRNA und dem Interferon-stimulierten Gen 56 mittels quantitativer Real Time PCR analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Induktionsphase an d3 und d7 der EAE, wenn die Tiere noch kei-

nerlei klinische Symptome zeigten, die IFN β mRNA-Expression sowohl im Rückenmark als auch in der Milz signifikant um das ca. 10-Fache anstieg (Daten nicht gezeigt).⁴ Im Rückenmark stieg die Expression mit Beginn der Effektorphase an d10 weiter an und erreichte seinen Höhepunkt (100-fach) an d14 und d17, wenn die Tiere schwerste klinische Symptome zeigten. Beim Übergang in die chronische Phase, wenn die Symptome wieder abklangen, blieb die Expression von IFN β allerdings erhöht (40 bis 60-fach). In der Milz dagegen sank die Expression mit dem Übergang in die Effektorphase ab d7 auf ein konstant niedriges Level (durchschnittlich 4-fach) über die gesamte Zeit des Krankheitsverlaufs.

Der Expressionsverlauf vom ISG56, repräsentativ für IFN-stimulierte Gene, im ZNS glich dabei dem Verlauf von IFN β . Währenddessen konnte für die Milz auch hier kein Anstieg detektiert werden. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es nur innerhalb des ZNS zu einem Effekt durch IFN β nach MOG-Immunisierung kommt.

Um die zelluläre Quelle von IFN β zu untersuchen, wurde am Höhepunkt der Krankheit an d17 die IFN β mRNA-Expression in intrazerebralen Zellpopulation analysiert. Dazu wurden mononukleäre Zellen aus dem Rückenmark von EAE-immunisierten C57BL/6N Wildtyp Tieren isoliert und auf die Zelloberflächenmarker CD45 und CD11b hin sortiert. Die qRT-PCR Ergebnisse ergaben die höchste Expression (ca. 140-fach) an IFN β mRNA innerhalb der CD45 intermediär und CD11b hoch exprimierenden Zellpopulation, die sich größtenteils aus den Mikroglia zusammensetzt. Innerhalb der CD45 und CD11b doppelt positiven Zellpopulation wurden nur geringe IFN-Level (ca. 10-fach) gemessen und innerhalb der CD11b negativen Populationen waren sie sogar nahe dem Detektionslimit. Auch für das Gehirn konnten ähnliche Expressionsmuster analysiert werden (Daten nicht gezeigt).⁴

Um die intrinsische Fähigkeit von Mikroglia IFN β zu produzieren weiter zu untersuchen, wurden primäre adulte Mikroglia aus Gehirn und Rückenmark von Wildtyp (WT) und IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen isoliert, kultiviert und mit verschiedenen pathogen-assoziierten molekularen Liganden stimuliert. Die Expression von IFN β /YFP in CD45 und CD11b positiven *in vitro* kultivierten adulten Mikroglia wurde durch-

⁴ Vgl. Kocur, M. J. (2012). Expression und Bedeutung von IFN beta in Mausmodellen für Multiple Sklerose und Polymikrobielle Peritonitis. Dissertation.

flusszytometrisch analysiert. Für die Liganden CpG2216 (TLR9), LPS (TLR4) und Pam3CSK4 (TLR2) konnte keine IFN β /YFP Induktion nachgewiesen werden. Lediglich die Stimulation mit poly(I:C) konnte die Expression von IFN β /YFP in bis zu 10% der Mikroglia induzieren, obwohl in allen Fällen mit Ausnahme von CpG2216 die Stimulation eine Aktivierung der Zellen hervorrief: Die Effizienz der Aktivierung der Mikroglia wurde über das kostimulatorische Molekül CD86 gemessen (Abb. 16a-c).

Eine mikroskopische Quantifizierung der Anzahl IFN β /YFP positiver Zellen bestätigte die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (Abb. 16d).

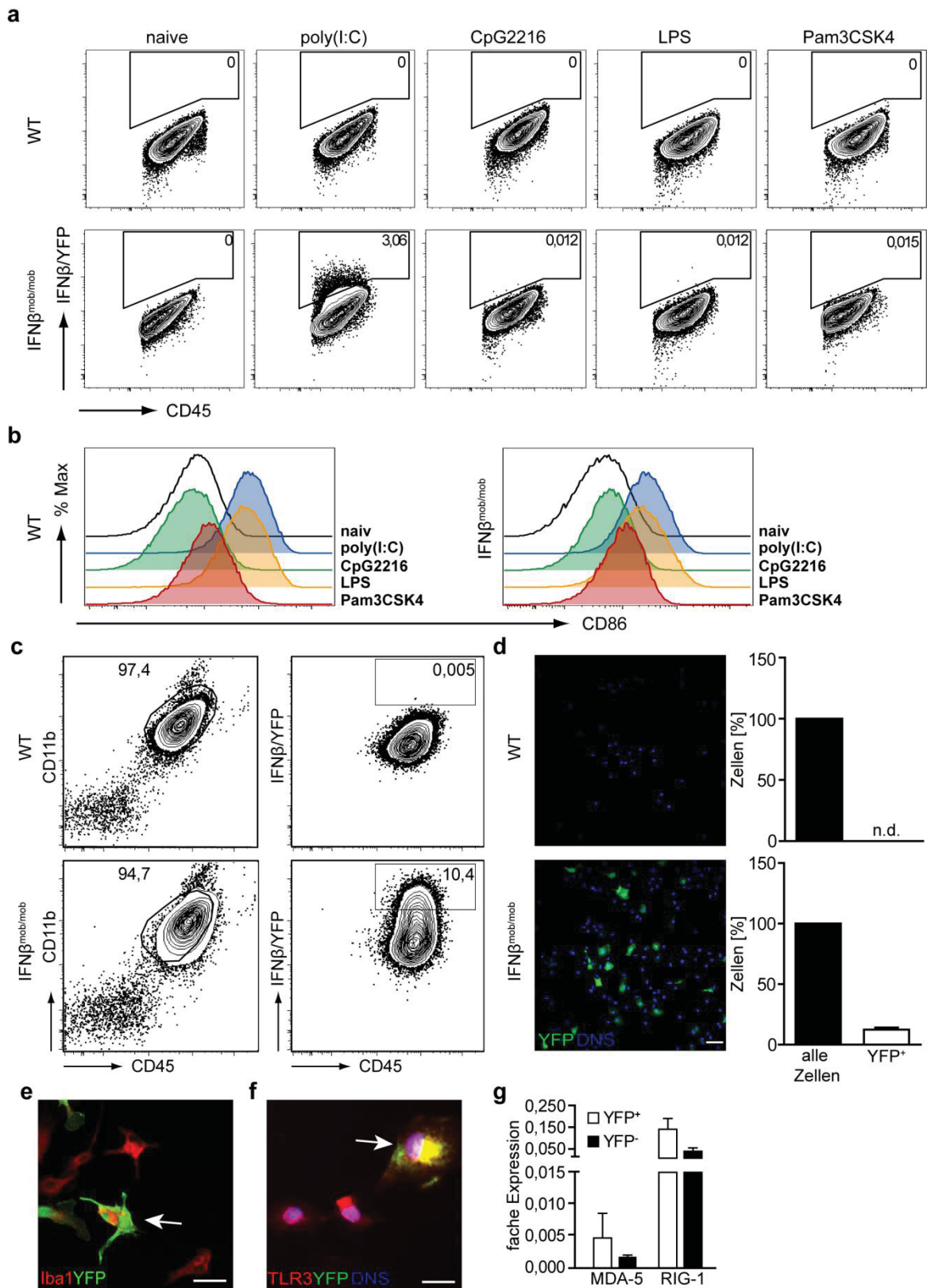


Abbildung 16: Analyse der Kapazität von Mikroglia IFN β zu produzieren.

a-c Vergleichende Analyse der Expression von IFN β /YFP nach Stimulation mit unterschiedlichen TLR-Liganden. Primäre Mikroglia aus WT und IFN β ^{mob/mob} Mäusen wurden für 24 h mit unterschiedlichen TLR-Liganden bzw. mit poly(I:C) (c) stimuliert und die IFN β /YFP (a und c) und CD86 (b) Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen. **d** Immunfluoreszenz poly(I:C) stimulierter

primärer Mikroglia aus WT und $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen. Zellen wurden angefärbt mit YFP kreuzreaktiven anti-GFP und die Anzahl der YFP-exprimierender Zellen ausgezählt. Angegeben sind Mittelwert \pm SD. $n = 3$. Maßstab: 50 μm . **e** und **f** Immunfluoreszenz poly(I:C) stimulierter primärer $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Mikroglia. Zellen wurden angefärbt auf anti-Iba1 (**e**) oder anti-TLR3 (**f**) zusammen mit YFP. Maßstab: 50 μm . **g** Primäre $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Mikroglia wurden stimuliert wie in (**c**), sortiert auf $\text{CD45}^+ \text{CD11b}^+ \text{YFP}^+$ (■) oder $\text{CD45}^+ \text{CD11b}^+ \text{YFP}^-$ (□) und die Expression der pathogen-spezifischer Mustererkennungsrezeptoren RIG-I und MDA-5 mittels qRT-PCR untersucht. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM.

Weiter konnte mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass die $\text{IFN}\beta/\text{YFP}$ positiven Zellen den Mikroglia marker Iba1 und TLR3, der für die Erkennung von poly(I:C) essentiell ist, exprimieren. Die qRT-PCR Untersuchung von $\text{IFN}\beta/\text{YFP}$ positiv und negativ sortierter Zellen zeigte zusätzlich eine leicht erhöhte Expression der mRNA der intrazellulären Rezeptoren MDA-5 und RIG-I in $\text{IFN}\beta$ Produzenten verglichen zu den Nicht-Produzenten (Abb. 16e-g).

3.2.2 Lokalisation der $\text{IFN}\beta$ produzierenden Zellen innerhalb des ZNS am Höhepunkt der EAE

Nicht nur die zelluläre Quelle von $\text{IFN}\beta$, sondern auch die anatomische Lokalisation der IFN -produzierenden Zellen kann einen Aufschluss über die Rolle dieses Zytokins innerhalb demyelinisierender Immunantworten im ZNS geben.

Um die Lokalisation der $\text{IFN}\beta$ Produzenten innerhalb des ZNS während der EAE zu untersuchen, wurde Rückenmark aus EAE Tieren an d17 nach Immunisierung isoliert und histologisch untersucht. Mittels Luxol Fast Blue Färbung konnten aktive Läsionen vornehmlich in der Substantia alba, der weißen Substanz, nachgewiesen werden. Die Gegenfärbung mit Nuklear Fast Red zeigte eine Akkumulation von Zellen, sogenannten Infiltraten innerhalb demyelinisierter Bereiche (Abb. 17a).

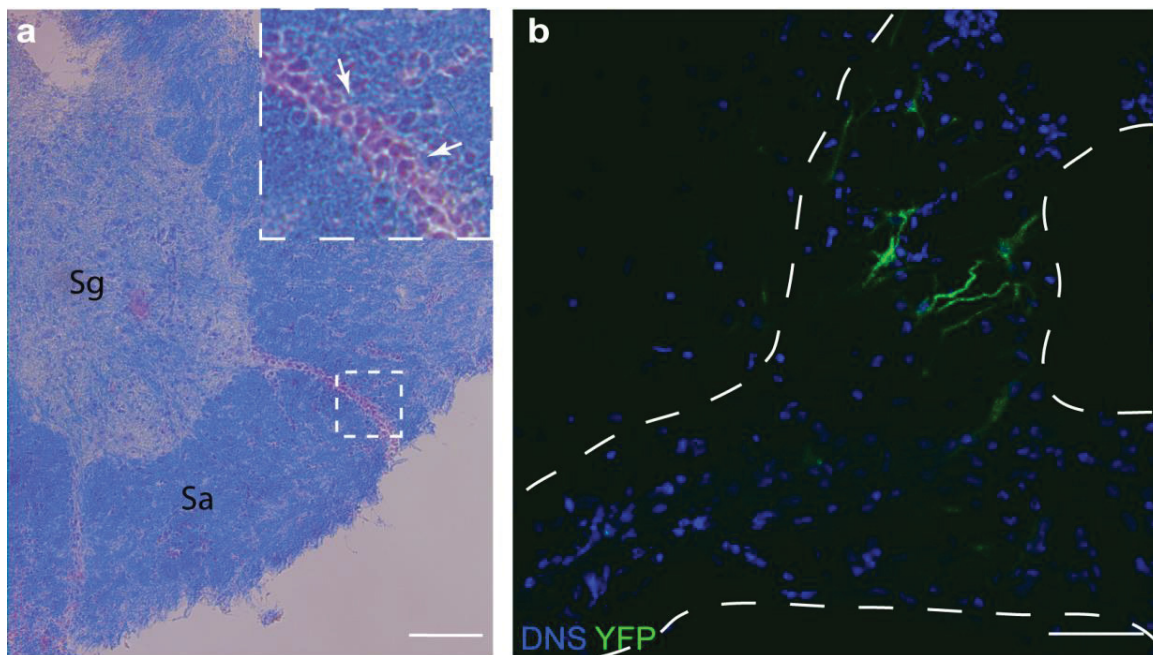


Abbildung 17: Lokalisation IFN β /YFP produzierender Zellen innerhalb aktiver Läsionen am Höhepunkt der EAE.

Histologische Analyse von Rückenmarksläsionen aus IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen an d17 nach EAE Induktion. **a** Gewebeschnitte vom Rückenmark wurden mit Luxol Fast Blue zur Detektion von Demyelinisierung und Nuclear Fast Red zur Visualisierung von Zellinfiltraten gefärbt. Weiße Pfeile weisen auf zelluläre Infiltrate hin. Maßstab: 200 μm . Sg: Substantia grisea, graue Substanz; Sa: Substantia alba, weiße Substanz. **b** IFN β /YFP $^+$ Zellen wurden mit anti-GFP angefärbt. Gestrichelte Linien markieren den Bereich zellulärer Infiltration charakteristisch für Läsionen. Maßstab: 50 μm .

Anschließend wurden Gewebeschnitte des Rückenmarks auf IFN β positive Zellen hin untersucht. Dazu wurden die Schnitte mit einem gegen das grün fluoreszierende Protein GFP gerichteten mit YFP kreuzreaktiven Antikörper angefärbt, um das gelb fluoreszierende Protein YFP zu visualisieren. Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie wurden IFN β /YFP positive Zellen überwiegend innerhalb der Infiltrationsbereiche detektiert, was darauf hindeutete, dass IFN β -produzierende Zellen am Höhepunkt der EAE innerhalb der aktiven ZNS Läsionen akkumulieren (Abb. 17b).

3.2.3 Charakterisierung der IFN β -produzierenden Zellen *in situ*

Die Analysen mittels qRT-PCR und Durchflusszytometrie ergaben, dass die Hauptproduzenten von IFN β während inflammatorischer demyelinisierender Prozesse eine Subpopulation aktivierter Mikroglia hämatopoetischen Ursprungs sind

(Kocur *et al.* 2015).⁵ Um die Beteiligung nicht-hämatopoetischer Zellen zu untersuchen, wurde das *in situ* Modell organotypischer Schnittkulturen aus dem Zerebellum (OSCs) angewendet. Zu diesem Zweck wurden OSCs von d10 alten IFN β ^{mob/mob} Mäusen präpariert und histologisch analysiert. Um eine IFN β Produktion zu induzieren wurden die OSCs für 24 h mit poly(I:C) stimuliert und die verschiedenen ZNS Zellpopulation angefärbt.

Eine Kolokalisation von IFN β /YFP konnte lediglich für den Mikroglia-Marker Iba1, jedoch nicht für den Astrozyten-Marker GFAP (Saures Gliafaserprotein) oder den neuronalen Marker NF-M (Neurofilament-Medium) nachgewiesen werden (Abb. 18a-c). Des Weiteren koexprimieren IFN β /YFP Zellen den Phagozytosemarker CD68, den Mikroglia-Aktivierungsmarker Mac3 und TLR3 (Abb. 18d-f).

Die Histologische Untersuchung der Rückenmarks-Gewebeschnitte ergab eine geringe Kolokalisation IFN β /YFP positiver Zellen mit CCR2, einem Marker für Makrophagen/Myeloide Zellen (Abb. 18g). Dagegen wies die Analyse von TLR 3 eine starke Kolokalisation mit IFN β /YFP positiven Zellen auf und unterstreicht damit ihre Kapazität direkt auf TLR3 Liganden zu reagieren (Abb. 18h).

⁵ Vgl. Kocur, M. J. (2012). Expression und Bedeutung von IFN beta in Mausmodellen für Multiple Sklerose und Polymikrobielle Peritonitis. Dissertation.

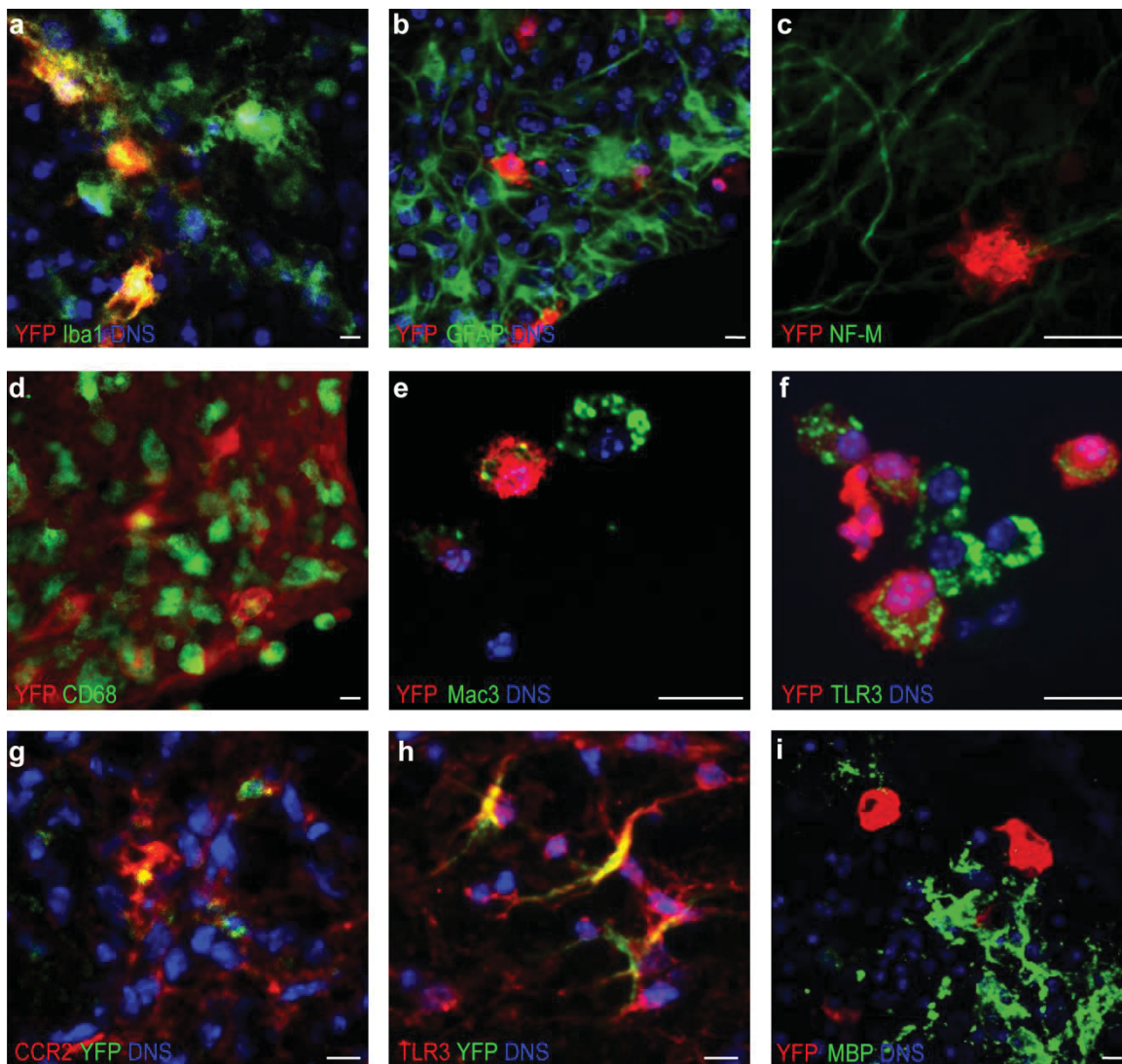


Abbildung 18: Analyse der zellulären IFN β Quelle in *in situ* stimulierten Organotypischen zerebellären Schnittkulturen.

a-f Immunfluoreszenz Analyse der Koexpression von IFN β /YFP und verschiedenen Zelloberflächenmarkern in OSCs. OSCs wurden präpariert aus d10 alten IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen und für 24h mit poly(I:C) stimuliert. Angefärbt wurden die OSCs auf YFP und Iba1 (**a**), GFAP (**b**), NF-M (**c**), CD68 (**d**), Mac3 (**e**), TLR3 (**f**). **g** und **h** Immunfluoreszenz Analyse von Rückenmarksschnitten aus d17 IFN $\beta^{mob/mob}$ EAE Tieren mit einem klinischen Score >2. Repräsentative Läsionen angefärbt auf YFP zusammen mit CCR2 (**g**) und TLR3 (**h**). **i** Lokalisation IFN β /YFP⁺ Zellen in unmittelbarer Nähe von Myelin Debris, angefärbt mit MBP, innerhalb der poly(I:C) stimulierten IFN $\beta^{mob/mob}$ OSCs. Maßstab: **a-i** 25 μ m.

Ein weiterer interessanter Befund war, dass IFN β /YFP positive Zellen vermehrt in Bereichen mit erhöhtem Anteil an Myelintrümmern akkumulierten, also in Bereichen, die durch spontane Demyelinisierung durch den mechanischen Stress bei der Präparation der OSCs hervorgerufen wurden (Abb. 18i).

Diese Ergebnisse gaben erste Hinweise darauf, dass IFN β -produzierende Zellen eine funktionelle Rolle innerhalb von demyelinisiertem Gewebe im ZNS einnehmen.

3.2.4 Untersuchung der Beteiligung von IFN β an phagozytotischen Prozessen innerhalb des ZNS

Die Beseitigung von Myelintrümmern oder Debris über Phagozytose durch Mikroglia ist wichtiger Prozess in der ZNS Autoimmunität (Sierra *et al.* 2013). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass neuentstehende Neurone ihren Wachstumsprozess sofort einstellen, wenn sie auf Rückstände apoptotischer Neurone treffen, und dass dies durch die Phagozytose von axonalem Debris durch Mikroglia positiv beeinflusst wird (Hosmane *et al.* 2012). Dies könnte darauf hindeuten, dass auch die Phagozytose von abgebauten Myelin Debris einen wichtigen Aspekt für die Neuroregeneration darstellt.

3.2.4.1 Der Einfluss von IFN β auf die Lokalisation von Mikroglia innerhalb von demyelinisiertem Gewebe und ihre phagozytotische Aktivität

Um den Einfluss der IFN β Produktion auf die Assoziation von Mikroglia mit Myelin Debris und damit auf ihre phagozytotische Kapazität zu untersuchen, wurden OSCs chemisch mittels Lysophosphatidylcholin (LPC) über einen Zeitraum von 16 h demyelinisiert (Birgbauer *et al.* 2004) und anschließend IFN β stimulierte Mikroglia auf diese transplantiert. Die neuronalen Strukturen der OSCs wurden dabei nicht geschädigt. Dies konnte mittels NF-M Färbung und dem Vergleich zwischen unbehandelten und LPC behandelten OSCs bestätigt werden (Abb. 19a). *In vitro* generierte primäre Mikroglia wurden mit rekombinantem IFN β (rIFN β) behandelt, mit 5-(und 6-)-4-Chlormethyl-Benzoyl-Amino-Tetramethylrhodamin (CMTMR) markiert und im Verhältnis von 1:1 mit unbehandelten 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin-5,5'-Disulfonsäure (DiD) markierten Zellen auf die OSCs transplantiert. Um eine bessere Darstellung der myelinisierten Strukturen zu erhalten wurden die OSCs aus PLP-EGFP Mäusen präpariert, bei denen das Proteolipid-Protein mit dem verbesserten GFP markiert und damit mikroskopisch darstellbar ist (Sobottka *et al.* 2011).

An zwei Zeitpunkten nach der Transplantation (1 h und 4 h) wurde die Lokalisation der Zellen innerhalb der demyelinisierten Bereiche quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die mit rIFN β behandelte Zellen sowohl nach 1 h als auch nach 4 h eine signifikant höhere Assoziation mit Myelin Debris aufwies als unbehandelte Zellen zu beiden Zeitpunkten (Abb. 19b). Das gleiche Migrationsmuster konnte für die Mikrogliazelllinie BV2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

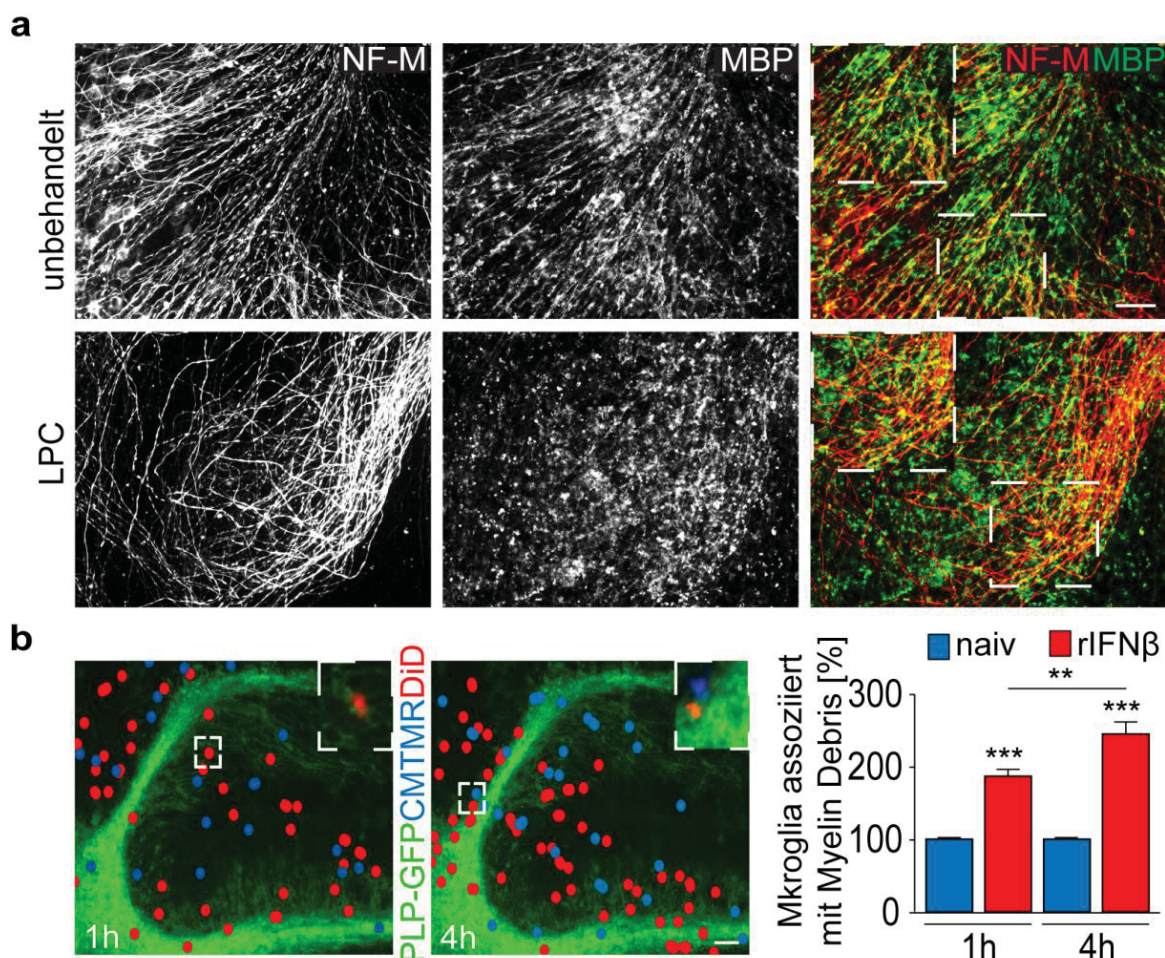


Abbildung 19: Lokalisation IFN β stimulierter Mikroglia innerhalb LPC-demyelinisierter OSCs.

a Visualisierung der Neurofilament- und Myelin-Strukturen in unbehandelten und LPC-demyelinisierten OSCs mittels Immunfluoreszenz. Maßstab: 100 μ m. **b** Immunfluoreszenz und quantitative Analyse der Lokalisation von ex vivo transplantierten naiven (blau) oder rIFN β stimulierten (rot) Mikroglia in LPC-demyelinisierten PLP-EGFP OSCs 1 h und 4 h nach Transplantation. Maßstab: 100 μ m. n = 16.

Zusätzlich zu den Migrationsergebnissen konnte zu verschiedenen Zeitpunkten (6 h und 24 h) nach IFN β Behandlung eine zum Teil deutliche Hochregulation

unterschiedlicher mit der Phagozytose assoziierter Gene in WT und IFN β ^{-/-} Zellen nachgewiesen werden. Zu diesen Genen gehören der Fc-gamma-Rezeptor 3 (Fc γ R3), der Komplementrezeptor 3 (CR3) und das Signal-regulatorische Protein α (SIRP α). Weitere untersuchte Gene sind der Makrophagen Scavenger-Rezeptor 1 (MSR1), der Milch-Fett-Globulin-Faktor (MFG)-8 und CD68, denen eine Beteiligung an den Mechanismen zur Phagozytose zugesprochen wird, sowie die für die Assemblierung des Phagosoms wichtigen Lysosom-assoziierten Membranproteine (LAMP) 1 und 2. IFNAR^{-/-} Zellen zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Hochregulation dieser Gene (Abb. 20a). Auch die Expression von ISG56 mRNA konnte nur für IFN β behandelte WT und IFN β ^{-/-} jedoch nicht für IFNAR1^{-/-} Zellen detektiert werden (Abb. 20b).

Um die phagozytotische Kapazität von Mikroglia zur Aufnahme von Myelin Debris direkt zu untersuchen, wurde ein Phagozytose-Assay mit fluoreszenzmarkiertem Myelin durchgeführt und die Phagozytoseeffizienz durchflusszytometrisch bestimmt.

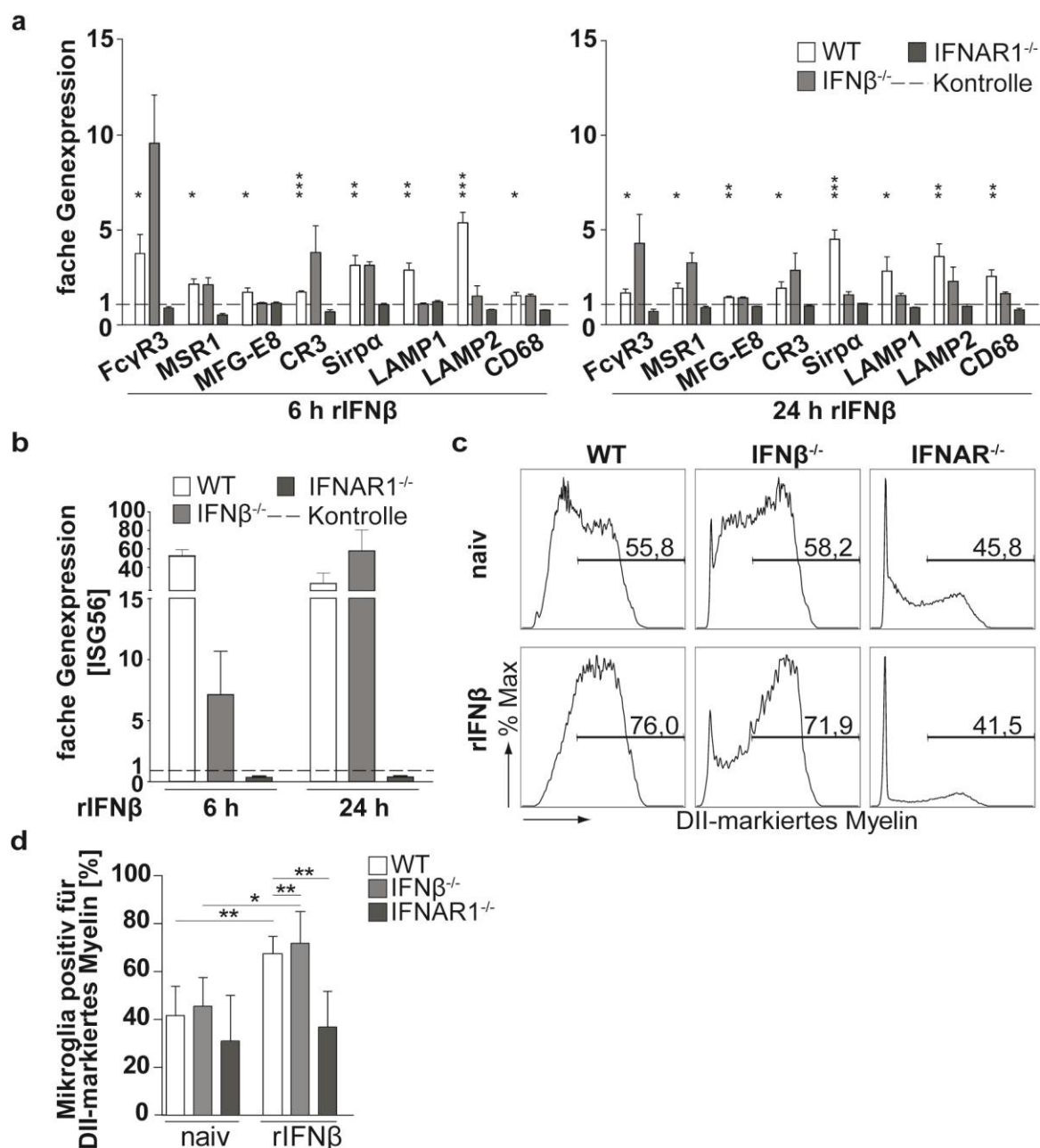


Abbildung 20: Der Einfluss von exogenem IFN β auf die Phagozytose von Myelin Debris.

a und **b** Analyse der Genexpression verschiedener in die Phagozytose involvierter Gene (**a**) und ISG56 (**b**) nach 6 h und 24 h rIFN β Stimulation in in vitro generierten primären Mikroglia aus WT (weiß), IFN β ^{-/-} (hell grau) und IFNAR1^{-/-} (dunkel grau) Mäusen mittels qRT-PCR. n = 2-4. **c** Durchflusszytometrische Messung der Phagozytoseeffizienz in vitro generierter primärer WT, IFN β ^{-/-} und IFNAR1^{-/-} Mikroglia. **d** Quantitative Auswertung der in **c** gemessenen Phagozytoseeffizienz. n = 4-7.

Die Effizienz zur Myelinphagozytose konnte durch die Zugabe von rIFN β verglichen zu unbehandelten Zellen gesteigert werden. Unter naiven Bedingungen zeigten ca. 56% der WT und 58% der IFN β ^{-/-} Zellen eine basale phagozytotische Aktivität, IFNAR^{-/-} Zellen lediglich 46%. Im WT und der IFN β ^{-/-} bewirkte die Kulti-

vierung mit rIFN β eine Zunahme der Phagozytoseeffizienz auf bis zu 76%, wohingegen auch hier die Kapazität der IFNAR1^{-/-} Zellen Myelin zu phagozytieren mit knapp 42% unverändert blieb (Abb. 20c und d).

3.2.4.2 Der Einfluss von IFN β auf den Abbau von Myelin Debris *in situ* und *in vivo*

Als nächstes wurde die Kapazität von IFN β die Phagozytose von Myelin zu induzieren *ex vivo* innerhalb der PLP-EGFP OSCs getestet, um die Bereinigung der Myelin Debris *in situ* beobachten zu können. Für diese Experimente wurden OSCs von d10 alten PLP-EGFP Mäuse präpariert. An d3 oder d6 nach Präparation wurden die Schnittkulturen für 16 h mit LPC demyelinisiert, 24 h später wurden sie mit IFN β oder PBS als Kontrolle behandelt, und weitere 24 h später wurde der Anteil an Myelin Debris innerhalb der Schnittkulturen mittels der Fluoreszenzintensität des GFP analysiert und quantifiziert (Abb. 21a). Durch die Verwendung der PLP-EGFP OSCs konnte eine deutliche Demyelinisierung nach LPC Behandlung mikroskopisch nachgewiesen werden. Nach der Inkubation mit rIFN β wurden signifikant geringere Anteile an Myelin Debris nachgewiesen als in den mit PBS behandelten Kontrollschnitten (Abb. 21b und c).

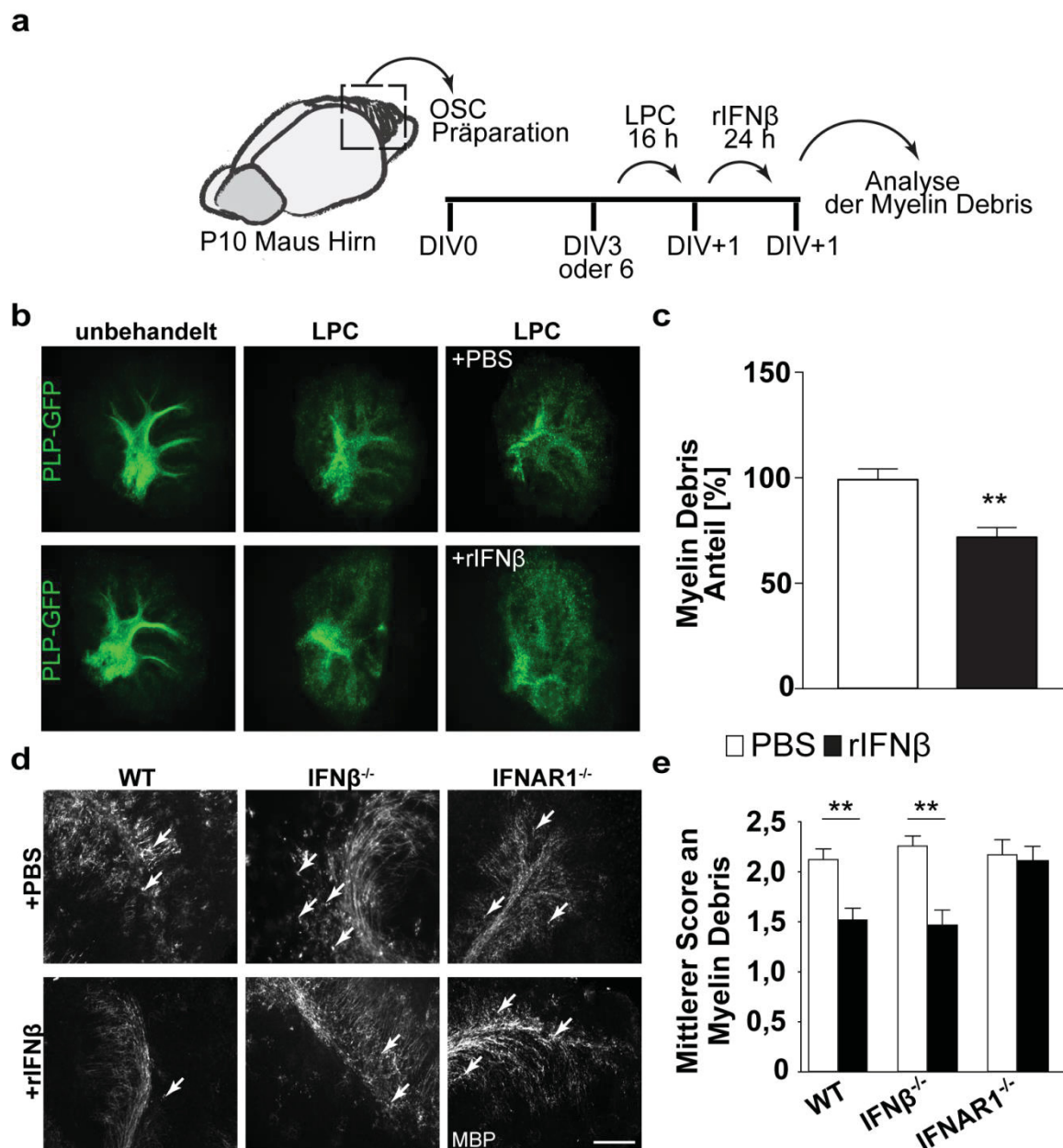


Abbildung 21: Der Einfluss von endogenem IFN β auf die Phagozytose von Myelin Debris.
a Darstellung der experimentellen Anordnung zur Analyse der Myelin Phagozytose in OSCs. DIV: Tage (Days) in vitro. **b** Immunfluoreszenzanalysen zur Untersuchung der Aufnahme von Myelin Debris in unbehandelten oder LPC-demyelinisierten PLP-EGFP OSCs. Maßstab: 1mm. **c** PLP-EGFP Intensität ausgewertet mit der Software *ImageJ*. rIFN β (■) stimuliert oder PBS (□) behandelt. **d** WT, IFN β ^{-/-} und IFNAR1^{-/-} OSCs wurden 3 Tage kultiviert, dann mit LPC demyelinisiert und für 24 h mit rIFN β stimuliert oder PBS behandelt und auf MBP gefärbt. Pfeile weisen auf Myelin Debris hin. Maßstab: 100 μ m. **e** Quantifizierung von Myelin Debris innerhalb der OSCs aus **d**, Scoring nach Skripuletz *et al.* 2013. rIFN β (■) stimuliert oder PBS (□) behandelt. n = 3-4.

In einem weiteren Experiment wurden dann OSCs von WT, IFN β ^{-/-} und IFNAR1^{-/-} Tieren präpariert, LPC demyelinisiert und mit rIFN β oder PBS inkubiert. Anschließend wurde der Anteil an Myelin Debris und somit der Effekt des exogen

verabreichten rIFN β unter Verwendung eines speziellen Scoring Systems quantifiziert (Skripuletz *et al.* 2013). Auch hier konnte ein deutlich niedrigerer Anteil an Debris in WT und IFN $\beta^{-/-}$ OSCs gemessen werden. Ein weiterer Hinweis dafür, dass die Bereinigung von Myelin Debris auf IFN β -abhängige Mechanismen beruht, waren die Ergebnisse der IFNAR1 $^{-/-}$ OSCs, in denen keine Veränderung in der Myelin Debris Bereinigung nach Zugabe von rIFN β festgestellt werden konnte (Abb. 21d und e).

Die Lokalisation von Myelin innerhalb von Mikroglia konnte mit Hilfe der sogenannten Focus stacking (Fokus-Stapelung) Mikroskopie und einem daraus entstehenden Z-Stack eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 22).

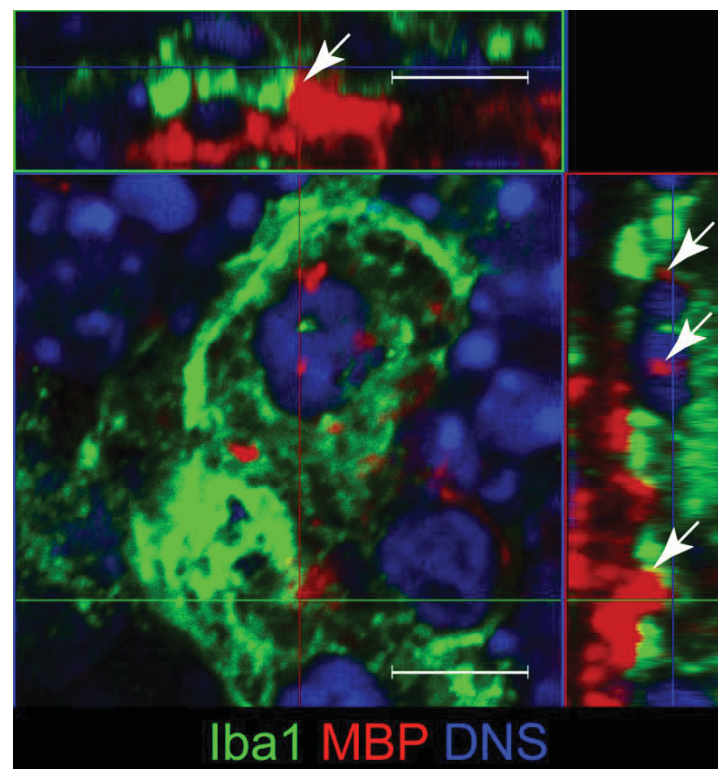


Abbildung 22: Myelin Phagozytose durch Mikroglia.

Konfokaler Z-Stack einer phagozytierenden Mikroglia Zelle in WT OSCs nach poly(I:C) Stimulation und LPC-Demyelinisierung. Pfeile weisen auf phagozytiertes Myelin hin. Maßstab: 10 μ m.

Diese Befunde und die Tatsache, dass IFN β produzierende Mikroglia innerhalb aktiver Läsionen im inflammatorischen ZNS lokalisierten deuteten darauf hin, dass die Bereinigung von Myelin Debris auch *in vivo* im Verlauf der EAE eine wichtige Rolle spielt. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden Gewebeschnitte vom Gehirn aus d17 WT, IFN $\beta^{-/-}$ und IFNAR1 $^{-/-}$ EAE-Tieren histologisch

untersucht. Innerhalb der Läsionen konnte eine Vielzahl an infiltrierten Zellen positiv für die Marker CCR2 und Mac3 visualisiert werden (Abb. 23a).

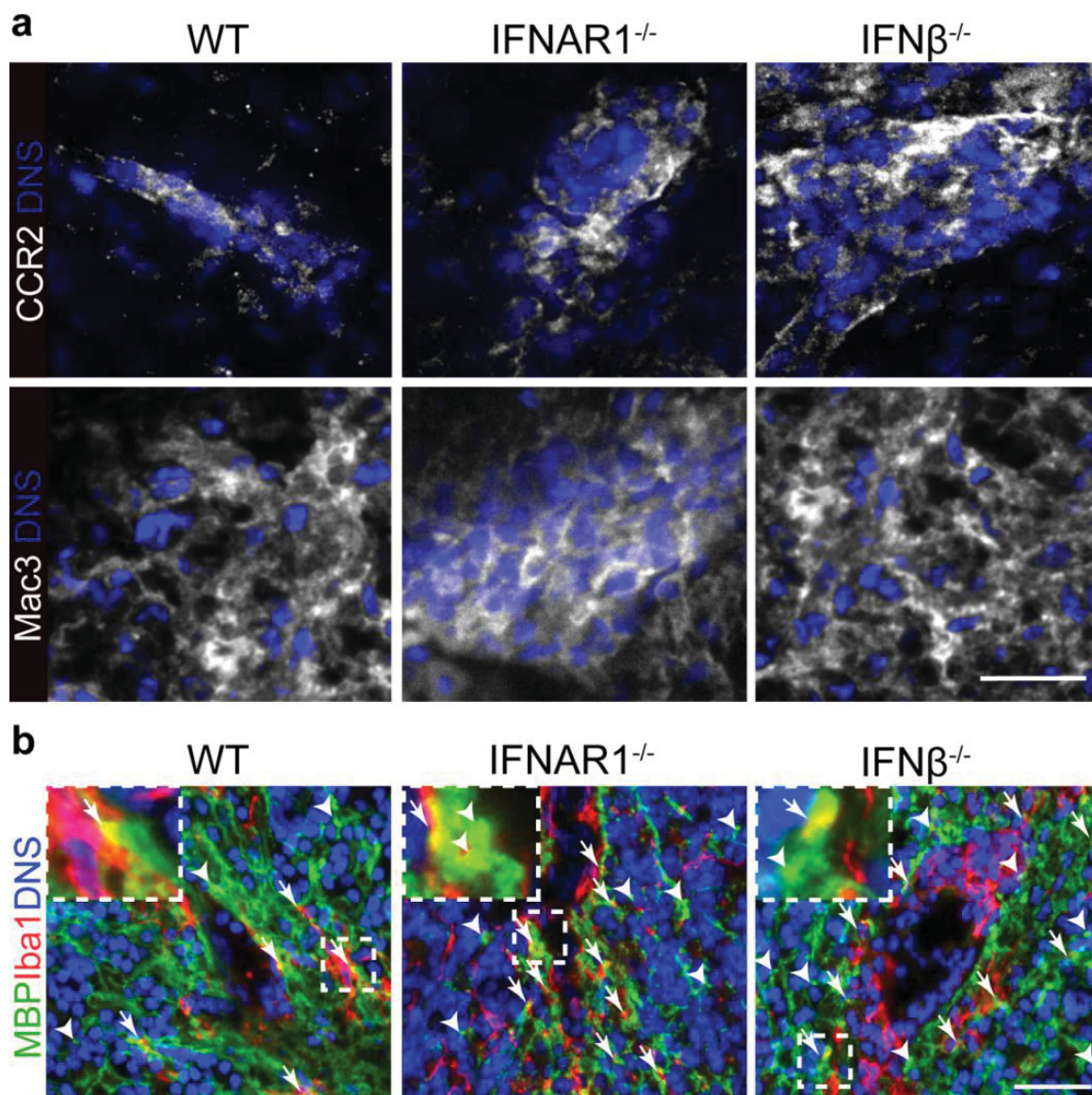


Abbildung 23: Charakterisierung der Mikroglia und ihrer Lokalisation zu Myelinstrukturen in ZNS Läsionen.

a Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten aus dem Gehirn von d17 WT, IFNβ^{-/-} und IFNAR1^{-/-} EAE-Tieren angefärbt auf CCR2 (obere Reihe) oder Mac3 (untere Reihe). Maßstab: 25 µm. **b** Kolokalisation von Iba1 positiven Mikroglia und MBP positivem Myelin Debris innerhalb der ZNS Läsionen. Pfeile weisen auf Myelin in direktem Kontakt mit aktivierter Mikroglia hin und Pfeilspitzen deuten auf Myelin Debris innerhalb der Läsion. Maßstab: 50 µm.

Eine genauere Untersuchung der Läsionen zeigte, dass die Lokalisation von Mikroglia, hier positiv für Iba1, innerhalb der Läsionen bestätigt werden konnte. Vielmehr noch konnte durch die zusätzliche MBP Färbung eine Akkumulation dieser Zellen in räumlicher Nähe zu Myelin Debris visualisiert werden. Hier war

die Anzahl an granulösem Myelin innerhalb der Läsionen von $\text{IFN}\beta^{-/-}$ und $\text{IFNAR1}^{-/-}$ Tieren verglichen zum WT, bei dem das Myelin gleichmäßiger verteilt wirkte, erhöht (Abb 23b).

3.2.5 $\text{IFN}\beta$ produziert von Mikroglia und seine Beteiligung am Abbau von Myelin Debris in organotypischen zerebellären Schnittkulturen

Um die zuvor generierten Ergebnisse, die sowohl den Einfluss von exogenem als auch endogenem $\text{IFN}\beta$ an der Phagozytose von Myelin aufzeigten, zu bestätigen und eine eindeutige Rolle $\text{IFN}\beta$ -produzierender Mikroglia an diesem Prozess zu unterstreichen, wurden die beiden hier verwendeten Untersuchungsmodelle zusammengeführt. Zum einen wurden *in vitro* generierte primäre Mikroglia, als zelluläre $\text{IFN}\beta$ Quelle verwendet und zum anderen OSCs für die Darstellung demyelinisiertem Gewebes. Hierzu wurden Mikrogliaulturen von $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen angelegt und an d14 für 24 h mit poly(I:C) stimuliert. Anschließend wurden die $\text{CD45}^+ \text{CD11b}^+$ Zellen nach $\text{IFN}\beta/\text{YFP}$ positiven und negativen sortiert. Parallel dazu wurden OSCs von d10 alten WT, $\text{IFN}\beta^{-/-}$ und $\text{IFNAR1}^{-/-}$ Mäusen präpariert und an d3 der Kultivierung LPC-demyelinisiert.

Auf jeweils eine Gruppe der OSCs wurden dann die $\text{IFN}\beta/\text{YFP}^+$ oder $\text{IFN}\beta/\text{YFP}^-$ transplantiert. Zur besseren Visualisierung der transplantierten Zellen, wurden diese zuvor DiD markiert (Abb. 24a und b).

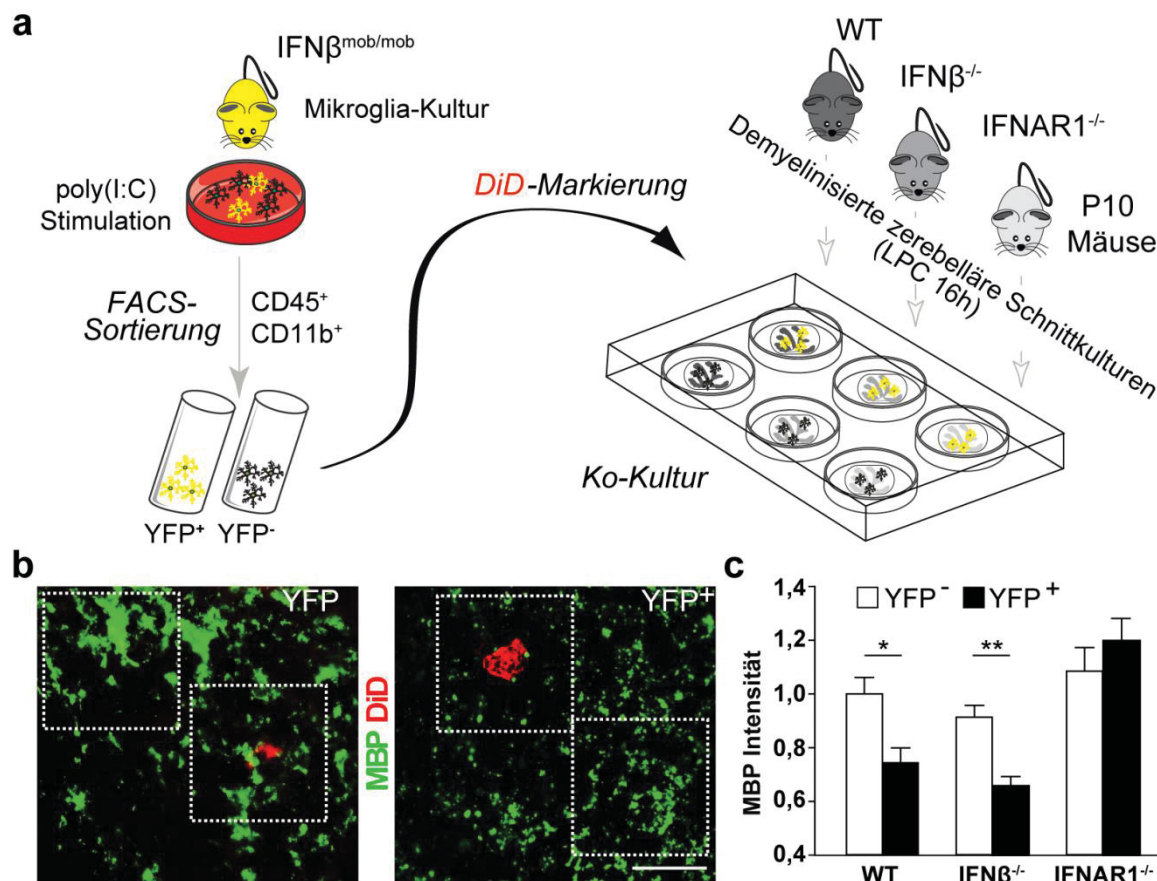


Abbildung 24: Untersuchung des Abbaus von Myelin Debris durch *in vitro* generierte primäre Mikroglia transplantiert auf organotypische zerebelläre Schnittkulturen.

a Darstellung der experimentellen Anordnung zur Analyse des Abbaus von Myelin Debris durch *in vitro* generierte primäre Mikroglia in OSCs. **b** Repräsentative Aufnahmen von YFP^- (\square) und YFP^+ (\blacksquare) sortierten Mikroglia nach Transplantation auf die OSCs. Maßstab: 50 μm . **c** Analyse der MBP Intensität als Indikator für den Abbau von Myelin Debris in den OSCs. Die Quantifizierung des Myelin Debris in unmittelbarer Nähe transplantierte Mikroglia wurde mit Hilfe von *ImageJ* über die Messung der MBP Intensität innerhalb von festgelegten Bereichen von 0,01 mm^2 bestimmt. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM. $n = 4$ für WT und $n = 3$ für $IFN\beta^{-/-}$ und $IFNAR1^{-/-}$ OSCs.

Die quantitative Auswertung der MBP Intensität zeigte eine deutliche Verminderung an Myelin Debris im Bereich um $IFN\beta/YFP^+$ transplantierte Zellen verglichen zu $IFN\beta/YFP^-$ innerhalb der OSCs von WT und $IFN\beta^{-/-}$ Mäusen. Auch hier zeigte die $IFNAR1^{-/-}$ keine Veränderung in der Intensität des MBP unabhängig vom transplantierten Zelltyp (Abb. 24c).

3.2.6 Beteiligung der Autoren

Ich habe als Ko-Erstautorin mit den innerhalb meines Promotionsprojektes durchgeführte Experimenten zu der Publikation „ $IFN\beta$ secreted by microglia me-

diates clearance of myelin debris in CNS autoimmunity“ beigetragen. Die Zugehörigkeit der Daten teilt sich wie folgt auf:

Die Etablierung des EAE Mausmodells und die Experimente (Sort, qRT-PCR) zur Zeitverlaufsstudie (Daten nicht gezeigt) wurden von Magdalena Kocur während ihres Promotionsvorhabens durchgeführt.⁶ Die Generierung primärer Mikroglia aus ZNS Gewebe und die in dem Zusammenhang entstanden Durchflusszytometrie-Daten (Abb. 16a-g, wobei die Färbungen und Aufnahmen 16e und f von Reiner Schneider gemacht worden sind, und 24a), die sowohl in die Publikation als auch in die vorliegende Dissertation Eingang fanden, sind von mir durchgeführt und generiert worden. Dazu zählen die Charakterisierung der Expression verschiedener Zelloberflächenmarker und die Phagozytose-Assays (Abb. 20). Die qRT-PCR Daten und deren Auswertung wurden zum Teil von Reiner Schneider oder von mir durchgeführt (Abb. 16 und 20). Die Immunisierung der Versuchstiere zur Generierung von histologischen Proben aus ZNS Geweben, die Aufbereitung und Herstellung der Gefrier-Gewebeschnitte wurde von mir innerhalb des Promotionsprojektes durchgeführt. Dazu zählen auch die Luxol Fast Blue Färbungen der Gewebeschnitte und die mikroskopische Analyse dieser (Abb. 17). Die Immunhistologische Färbung der Gewebeschnitte und die Mikroskopie wurden von Reiner Schneider (Abb. 18, 22 und 23) und mir (Abb. 17 und 22) durchgeführt. Die Generierung, Behandlung und histologische Analyse sowie die Mikroskopie der gesamten organotypischen zerebellären Schnittkulturen (Abb. 18, 19, 21 und 24) wurden von Reiner Schneider durchgeführt. Die Interpretation der in allen Abbildungen dieses Experimentals teils gezeigten Daten und das Erstellen der Abbildungen des Manuskripts erfolgten durch Magdalena Kocur, Reiner Schneider, Judith Alferink, Stefanie Scheu und mich. Stefanie Scheu ist für die Korrespondenz der Publikation zuständig. Die Original Publikation mit den dazugehörigen Methoden ist dieser Arbeit als Anhang beigefügt (siehe Abschnitt 7.1).

⁶ Vgl. Kocur, M. J. (2012). Expression und Bedeutung von IFN beta in Mausmodellen für Multiple Sklerose und Polymikrobielle Peritonitis. Dissertation.

4 Diskussion

Die Bedeutung von IFN β sowohl in der Immunabwehr gegen verschiedene Pathogene als auch in der Regulation von Autoimmunität ist unumstritten. Trotzdem bestehen zum Teil Kontroversen zwischen vorteilhaften und schädlichen Effekten.

Ziel dieser Arbeit war es die immunregulatorischen Effekte von IFN β in zwei unterschiedlichen Krankheitsmodellen, der antiviralen Immunabwehr und den inflammatorischen Prozessen im ZNS, zu untersuchen. Unter Verwendung von Zytokin-Fluoreszenz-Reportermausmodellen wurde zunächst die zelluläre Zytokinquelle identifiziert und der Phänotyp der produzierenden Zellen genauer charakterisiert. Zum einen wurde der Einfluss von IFN β auf das proinflammatorische Zytokin IL-12 im Kontext einer viralen Infektion, und zum anderen wurde seine Wirkung auf die inflammatorischen Prozesse während der EAE näher untersucht.

4.1 Der Einfluss von IFN β und dem Typ I IFN Rezeptor Signalweg auf die IL-12 Expression in einem Modell der antiviralen Immunantwort - Ko-Regulation oder Abhängigkeit?

Seit seiner Entdeckung im Kontext viraler Interaktion, Mitte des 20. Jahrhunderts durch Isaacs und Lindenmann, wurde IFN β zu einem der am intensivsten untersuchten Zytokine. Angefangen mit der Entdeckung, dass es die Proliferation infizierter Zellen hemmt, dadurch die virale Vermehrung unterbindet und die Elimination dieser Zellen initiiert, bis hin zur Beteiligung an der Induktion der adaptiven Immunantwort und seiner Wirkung in anderen Infektions- und Krankheitsmodellen. Obwohl IFN β im Verlauf der Immunantwort gegen mikrobielle Infektionen meist als protektiv beschrieben wurde, konnten andere Studien auch negative Effekte im Zusammenhang pathogener Infektion aufzeigen (Davidson *et al.* 2014, Teles *et al.* 2013, Harris *et al.* 2010, Doughty *et al.* 2006). Im Zusammenhang einer bakteriellen Sepsis wurden die Effekte von IFN β bereits als detrimentell beschrieben und auch Untersuchungen persistenter viraler Infektionen wie HIV oder HCV deuten auf eine Beteiligung von Typ I IFN an der Pathogenese der Infektion hin (Nansen und Randrup Thomsen 2001, Bolen *et al.* 2013, Sedaghat

et al. 2008). Nach persistenter Infektion mit LCMV Clone 13 beispielsweise, führte die Blockade von Typ I IFN Signalwegen zu einer niedrigeren viralen Last (Teijaro *et al.* 2013, Ng *et al.* 2015).

4.1.1 Ein deutlicher Anstieg von IL-12 und IFN β im Serum deutet auf eine IFNAR-unabhängige Sekretion im Kontext einer akuten LCMV Infektion hin

Während der akuten Infektion zeigten bisherige Analysen zum Zytokingehalt von Typ I IFN und IL-12 im Serum an Tag 2 nach LCMV Infektion in C57BL/6 Mäusen zwar eine Induktion von IFN β oder IFN α , jedoch konnte kein IL-12p40 in diesen Tieren nachgewiesen werden (Cousens *et al.* 1997, Keppler *et al.* 2012, Cousens *et al.* 1999). In einer Studie von Dalod und Kollegen wurden C57BL/6 mit 129SvEv Wildtypen verglichen, und es wurde gezeigt, dass es in beiden Stämmen nach akuter Infektion mit LCMV Armstrong Klon E350 zu vergleichbaren Ergebnissen für beide Zytokine kam (Dalod *et al.* 2002). Die in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden in Wildtyp-Mäusen auf C57BL/6 Hintergrund durchgeführt, und als Virusmodell wurde der LCMV WE Stamm verwendet, der ebenfalls eine akute Infektion hervorruft und für den bekannt ist eine moderate IFN β Expression nach 36-48 h zu induzieren (Keppler *et al.* 2012).

Für IFN β konnte ähnlich wie in den bereits publizierten Studien eine Induktion in IFNAR1^{+/+} Tieren nachgewiesen werden. Für IL-12p40 waren die Werte der infizierten Tiere ähnlich der basalen Level in den naiven Kontrollen und damit auch hier keine Induktion des Zytokins messbar. In den IFNAR1^{-/-} Tieren jedoch konnte sowohl für IL-12p40 als überraschenderweise auch für IFN β eine deutliche Induktion beider Zytokine 48 h nach Infektion nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch andere Studien für die IL-12p40 Produktion in IFNAR1^{-/-} Tieren, jedoch auf 129Sv Hintergrund und nicht wie hier auf C57BL/6. Dennoch beschreiben all diese Daten in Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen, dass IL-12p40 durch die Induktion von Typ I IFN, als Antwort auf eine virale Infektion, gehemmt wird (Cousens *et al.* 1997, Dalod *et al.* 2002). Anders als für IL-12p40 wurde für die Typ I IFN Produktion immer von einem positiven Feedback-Mechanismus ausgegangen, der in IFNAR-defizienten Tieren wegfällt und damit die Induktion einer verstärkten Typ I IFN Antwort unterbindet. Für IFN α konnten

Dalod und Kollegen dies nach MCMV Infektion auch zeigen, die IFN β Produktion wurde hier aber nicht analysiert. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen einen deutlichen Anstieg der IFN β -Serumspiegel unter IFNAR-defizienten Bedingungen und im Vergleich zum WT einen mehr als doppelt so hohen Gehalt an IFN β im Serum. Für die Infektion mit LCMV oder anderen Viren sind bisher keine Daten bekannt, die auf einen negativen Einfluss hindeuten. In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass erhöhte IFN β -Serumspiegel in IFNAR1^{-/-} Mäusen mit einer höheren viralen Last einhergehen. Diese wurde in der Milz der IFNAR1^{-/-} Mäuse im Vergleich zu IFNAR1^{+/+} Mäusen gemessen, was an den fehlenden durch IFN-induzierten antiviralen Mechanismen liegen könnte. Die erhöhte virale Replikation könnte eine verstärkte IFN β -Produktion zur Folge haben und damit eine Akkumulation des Zytokins durch die fehlende Rezeptor-Internalisierung oder auf eine IFNAR-unabhängige IFN β -Quelle deuten (Kochs *et al.* 2010). Auch die Tatsache, dass intravenös infiziert wurde, könnte eine Rolle spielen, da das Blut die direkte Infektionsseite darstellt und damit früh nach der Infektion immer noch hohe Werte an unverbrauchtem Zytokin messbar sein könnten.

Im Gegensatz zu den Daten nach viraler Infektion konnte für die Stimulation mit synthetischen TLR Liganden eine Induktion der IL-12p70 Expression durch Typ I IFN gezeigt werden (Gautier *et al.* 2005). So wurden in dieser Arbeit die pathogen-assoziierten molekularen Liganden poly(I:C) (TLR 3) und CpG (TLR 9) verwendet um einen Vergleich zwischen viralem Infektionsmodell und synthetischer Stimulation zu untersuchen. Bei beiden Liganden handelt es sich um potente Zytokin-Induktoren (Gautier *et al.* 2005). Im zeitlichen Verlauf von 24 Stunden nach poly(I:C) Stimulation, konnte zu keinem der gemessenen Zeitpunkte ein Unterschied im Konzentrationsverlauf zwischen IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Tieren detektiert werden, weder für IL-12p40 noch für IFN β . Nach Stimulation mit CpG konnte eine erhöhte, jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikante, IL-12p40 Konzentration in den IFNAR1^{-/-} Proben gemessen werden. Für die IFN β Konzentration konnte lediglich zu einem Zeitpunkt (9 h p.i.) ein signifikant höherer Wert in den IFNAR1^{+/+} Tieren detektiert werden, während der Verlauf zu den übrigen Zeitpunkten ebenfalls keinen Unterschied aufwies. Die von Gautier und Kollegen publizierten Daten wurden in einem *in vitro* System aus Knochenmark-generierten DCs durchgeführt. Eine poly(I:C) Stimulation dieser myeloiden DCs konnte eine deutliche Typ

I IFN Produktion hervorrufen, jedoch konnten nur in der Verbindung von poly(I:C) mit einem weiteren Liganden nicht aber nach alleiniger poly(I:C) Stimulation IL-12 gemessen werden. CpG wurde in dieser Studie nicht verwendet. Jedoch wurde diskutiert, dass die Produktion von IL-12p40 nicht so sehr von der Typ I IFN Expression und den dadurch aktivierten Signalwegen abhängig ist (Gautier *et al.* 2005, Bradford *et al.* 2002). In der angegebenen Studie wurde zusätzlich die IL-12 Expression mit IFN γ stimuliert und nicht in Bezug auf die gleichzeitige Produktion von IL-12 und die Induktion von Typ I IFN nach Stimulation mit CpG untersucht. Zudem ist der Vergleich von *in vitro* und *in vivo* Studien schwierig, da letzteres auf Grund verschiedener physiologischer Bedingungen weitaus komplexer ist. Ein direkter Vergleich zu den Daten von Gautier und Kollegen ist also nicht möglich.

Die Daten hier zeigen, dass nicht nur eine IFNAR-unabhängige IFN β -Quelle für die Expression beider Zytokine eine Rolle spielen könnte, sondern deuten auch auf einen Einfluss des jeweiligen Signalwegs zur Pathogen-Erkennung hin.

4.1.2 Die Präsenz der IL-12p40 und IFN β Produzenten innerhalb verschiedener Milzareale spricht für eine funktionsspezifische Lokalisation der Zellen

Die Milz, als größtes sekundäres lymphatisches Organ stellt eines der Hauptproduktionsorte für IL-12p40 und IFN β dar. Dies konnte bereits in Vorversuchen bestätigt werden.⁷ Daher konzentrierten sich die Analysen zu Lokalisation der Zytokinproduzenten in dieser Arbeit auf die Milz. Die immunhistologische Lokalisation der IL-12p40 und IFN β Produzenten wies Unterschiede zwischen allen getesteten Infektions- bzw. Stimulationsbedingungen auf. Im viralen Infektionsmodell wurden in IFNAR1^{+/+} Mäusen die IL-12p40/GFP⁺ Zellen hauptsächlich innerhalb der T Zell-Zone der weißen Pulpa lokalisiert, während die IFN β /YFP⁺ Zellen in verschiedenen Arealen detektiert werden konnten. Für beide Zytokine konnte jeweils das gleiche Lokalisationsmuster auch in den IFNAR1^{-/-} Milzen nachgewiesen werden. Hier wurde das Verteilungsmuster, das bereits im WT analysiert

⁷ Vgl. Kocur, M. J. (2012). Expression und Bedeutung von IFN beta in Mausmodellen für Multiple Sklerose und Polymikrobielle Peritonitis. Dissertation.

werden konnte, anhand der prozentualen Werte für die einzelnen Areale jedoch noch deutlicher.

Für den LCMV Klon 13, der eine persistente Infektion hervorruft, wurde gezeigt, dass sich das Virus in den ersten 24 h nach Infektion überwiegend in der Marginalzone ausbreitet. In IFNAR-defizienten Tieren hingegen, breitet es sich über die Marginalzone hinaus in die anderen Areale aus (Ng *et al.* 2015). Hier waren die Zielzellen des Virus DCs und MΦs und der Infektionsstatus dieser Zellen korrelierte mit den immunhistologischen Befunden zur viralen Lokalisation. Zusätzlich führt eine Infektion mit dem Klon 13 zu einer Desorganisation des Gewebes der sekundären lymphatischen Organe und einer gestörten Lymphozyten Migration (Muller *et al.* 2002, Odermatt *et al.* 1991). Diese Desorganisation konnte durch eine Blockade des IFNAR Signalwegs oder die genetische Deletion des IFNAR unterbunden werden (Ng *et al.* 2015, Teijaro *et al.* 2013). Während eine Beteiligung von IFNβ an den frühen Prozessen der antiviralen Aktivität und der späteren Lokalisation des Virus in der persistierenden LCMV Infektionen eher gering eingeschätzt wird, scheint seine Rolle in der akuten Infektion noch nicht vollständig geklärt zu sein.

Für die IL-12p40/GFP Produzenten ergab sich sowohl nach viraler Infektion als auch nach Stimulation mit poly(I:C) und CpG das gleiche Lokalisationsmuster. Die Zellen konnten mit einer prozentualen Verteilung zwischen 55% und 90% überwiegend in der T Zell-Zone detektiert werden und im Falle des fehlenden IFNAR1 Signalwegs für alle Stimulationsbedingungen ebenfalls in gesteigerter Frequenz. IL-12 ist involviert in die Induktion von IFN-γ in T und NK Zellen, sowie an der Differenzierung bzw. Proliferation zytotoxischer T und NK Zellen und der Induktion der T_H1 Antwort (Manetti *et al.* 1994, Hsieh *et al.* 1993). Seine Lokalisation innerhalb der T Zellareale unterstützt diese Befunde und deutet auf eine spezifische funktionelle Positionierung hin. Die Lokalisation der IFNβ/YFP Produzenten nach Stimulation mit poly(I:C) ergab eine Verteilung, die sich hauptsächlich auf die rote Pulpa und Marginalzone und nach CpG Stimulation, wie für die IL-12p40/GFP⁺ Zellen deutlich, auf die T Zell-Zone beschränkte. Dieses Muster konnte bereits für eine spezielle Subpopulation IFNβ-produzierender pDCs gezeigt werden, die nach CpG Stimulation strikt im Bereich der T Zell-Zone in der weißen Pulpa akkumulierten (Bauer *et al.* 2016).

Die Daten der immunhistologischen Analyse könnten also auf unterschiedliche funktionsabhängige Lokalisationsmuster der IFN β Produzenten hindeuten. Als initial induziertes Zytokin im Kontext viraler Infektionen mit Beteiligung an der Induktion des adaptiven Immunsystems könnte die Lokalisation innerhalb aller Areale sprechen. Innerhalb der Marginalzone, in der die aus der Blutbahn zirkulierenden Antigene die Milz infiltrieren, sind Zellen wie M Φ , DCs und B Zellen ansässig, die die Antigene aufnehmen und prozessieren können. Dadurch werden Prozesse wie die Eliminierung infizierter Zellen durch Phagozytose, die Antikörperproduktion, aber auch die Antigenpräsentation an T Zellen und ihre Aktivierung induziert. Zum einen passieren die T Zellen innerhalb der Marginalzone bereits eine Vielzahl von APZs zum anderen migrieren diese aber auch in die Areale der weißen Pulpa, um ihre Aufgabe in der Aktivierung der T Zellantwort zu erfüllen. Die Lokalisation IFN β -produzierender Zellen lässt sich also auch durch ihre Beteiligung an der Aktivierung der adaptiven Immunantwort erklären. Ihr Migrationsmuster in die B und T Zellareale stellt sicher, dass sie in direkten Kontakt mit diesen Zellen kommen bzw. können sie T Zellen z.B. auch in diese Areale rekrutieren. Im Fall der IFN β -produzierenden pDCs ist bekannt, dass sie unter naiven Bedingungen sowohl in der roten als auch innerhalb der weißen Pulpa auftreten können, die dann CCR7-abhängig die Marginalzone und in geringer Anzahl die T Zell-Zonen infiltrieren (Asselin-Paturel *et al.* 2005, Bauer *et al.* 2016).

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der Fokus deshalb auf eine detaillierte Charakterisierung der IL-12p40 und IFN β Produzenten gelegt.

4.1.3 IL-12p40 und IFN β konnten im IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ x IL-12 $^{\text{get40/get40}}$ Doppel-Reportermausmodell simultan gemessen werden und sind abhängig vom TLR-Stimulationsroute IFNAR-unabhängig exprimiert

Unter Verwendung eines Zytokin-Fluoreszenz-Doppel-Reportermausmodells für IFN β und IL-12 (Scheu *et al.* 2008, Reinhardt *et al.* 2006) konnte die Expression beider Zytokine simultan nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde dieses Reportermausmodell auf IFNAR1-defizientem Hintergrund genutzt, um den Einfluss des Typ I IFN Rezeptorsignalwegs auf die Zytokinproduktion zu untersuchen. Zu

diesem Zweck wurden Splenozyten aus LCMV infizierten oder poly(I:C) oder CpG injizierten Mäusen durchflusszytometrisch auf die Expression von IL-12p40/GFP und IFN β /YFP hin untersucht.

In naiven IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Tieren konnten keine IFN β Expression, jedoch eine basale Expression von IL-12p40 detektiert werden, mit geringerer Frequenz in den IFNAR1^{-/-} Tieren. Sowohl die Infektion mit LCMV, als auch die Stimulation mit poly(I:C) oder CpG resultierten in einer Induktion von IL-12p40 und IFN β , wobei beide Zytokine eher exklusiv exprimiert wurden und nur eine geringe Frequenz an Zellen, die beide simultan exprimierten, gemessen werden konnten. Gleiches konnte für den WT nach poly(I:C) oder CpG bereits in einem Tiermodell der Sepsis, der Colon-Ascendens Stent-Peritonitis (CASP), gezeigt werden (Kocur und Scheu, unpublizierte Daten). Die gleichzeitige Expression beider Zytokine in IFNAR1^{-/-} Mäusen auf Einzelzellebene konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden und resultierte sowohl in IFNAR-unabhängigen, als auch durch den Knockout reduzierten Frequenzen. Nach LCMV Infektion und CpG Stimulation waren die Frequenzen für IL-12p40/GFP gesteigert, nach poly(I:C) Stimulation reduziert. Für die IFN β /YFP Expression wurden eher reduzierte Frequenzen gemessen. Die Produktion von IL-12p40/GFP wies in allen Fällen höhere Frequenzen auf, als die IFN β /YFP Expression. Die Induktion durch CpG resultierte in der stärksten IL-12p40 Antwort. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass unmethylierte CpG Motive in vielen verschiedenen Pathogenen vorkommen und MyD88-assoziierte Signalwege zur NF- κ B Aktivierung führen, die wiederum proinflammatorische Effekte initiieren (Hsieh *et al.* 1993).

Ohne den positiven Typ I IFN Feedback Mechanismus durch den IFNAR ist die Produktion weiterer Typ I IFNs unterbrochen und in diesem Fall ebenfalls die IFN β Expression runterreguliert. Der fehlende IFNAR-Feedback Effekt beeinflusst die IL-12p40 Expression in den IFNAR1^{-/-} Mäusen dabei in Abhängigkeit vom Stimulus entweder supprimierend oder stimulierend. Diese Ergebnisse werden unterstützt von verschiedenen Daten, die zum einen zeigen, dass IL-12 in IFNAR^{-/-} oder STAT1^{-/-} nach Stimulation mit pathogen-assoziierten molekularen Liganden herunterreguliert wird, im viralen Infektionsmodell im IFNAR^{-/-} jedoch gesteigert exprimiert wird (Cousens *et al.* 1997, Gautier *et al.* 2005). Die Regulation von IL-12 durch IFN β könnte dabei auf transkriptioneller Ebene stattfinden,

da IL-12p35 responsiv gegenüber IFN γ ist. Die Signalwege von Typ I IFN und IFN γ über IRF 1 und IRF 8 können sich teilweise überlappen, was zu einer Regulation der IL-12p35 Expression führt und damit auch die der IL-12p40 Untereinheit beeinflussen könnte (Trinchieri und Sher 2007, Liu *et al.* 2004). In IFNAR1^{-/-} Tieren könnte die Hochregulation von IL-12 auf eine IFNAR-unabhängige IFN β oder auch IFN α Produktion zurückzuführen sein, wie es auch für VSV gezeigt werden konnte. Auch für poly(I:C) wurde eine IFNAR-unabhängige IFN α Expression beschrieben wenn auch deutlich geringer als in WT Tieren (Barchet *et al.* 2002).

Die quantitative Auswertung durch Berechnung der absoluten Zellzahlen für die IL-12p40 und IFN β Produzenten bestätigte größtenteils die Ergebnisse der relativen Frequenzen. Während die LCMV infizierte und CpG stimulierte Kohorte eine Induktion der absoluten IL-12p40/GFP Expression, mit deutlicher Zunahme in der IFNAR1^{-/-} aufwies, zeigte sich für poly(I:C), dass es sich bei diesem Liganden um einen weniger potenten IL-12p40 Induktor handelt. Anders als im Falle von IFN β : Hier konnte für poly(I:C) eine deutliche Induktion der IFN β Expression bestätigt werden, auch wenn LCMV und CpG erneut eine deutlich höherer absolute Expression zeigten. Für die IFN β Expression konnten die absoluten Zahlen nach LCMV und CpG die Tendenz der durchflusszytometrisch gemessenen Frequenzen nicht bestätigen, hier zeigte sich nach LCMV und CpG eher eine Zunahme in der IFNAR1^{-/-}, jedoch ohne Signifikanz. Lediglich die Reduktion der IFN β Produktion in der IFNAR1^{-/-} nach poly(I:C) war signifikant und bestätigte das Bild der relativen Zellfrequenz, die in der Knockout ebenfalls reduziert war. Hier spielt jedoch auch die Tatsache, dass die absoluten Zellzahlen aus der Summe der jeweils einzelexprimierenden Zellpopulation (IL-12p40 oder IFN β) und der doppelt positiven Population (IL-12p40/IFN β) gebildet wurden, eine Rolle. Unter Betrachtung der prozentualen Verteilung der Zytokinproduzenten wurde nochmals deutlich, dass die Mehrzahl der Zellen positiv für IL-12p40 war. Dies gilt sowohl für die verschiedenen Stimuli, als auch für den Vergleich der beiden Genotypen und zeigt, dass trotz der Tatsache, dass jede Zelle befähigt ist Typ I IFN zu produzieren, nur ein sehr geringer Anteil an Zellen es tatsächlich exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde die IL-12p40 Produktion von einer größeren Anzahl an Zellen übernommen. Bisher wurde die Expression von IL-12 und Typ I IFN gleichzeitig

nur mittels ELISA und qRT-PCR gemessen, dazu wurden vor allem *in vitro* generierte Zellkultur Überstände verwendet, was jedoch keine Rückschlüsse über die simultane Expression beider Zytokine auf Einzelzellebene zuließ.

4.1.4 Die Phänotypische Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie identifiziert die Hauptproduzenten von IL-12p40 und IFN β als Subpopulationen dendritischer Zellen

Die phänotypische Charakterisierung der Zytokinproduzenten sollte weitere Erkenntnisse über die möglichen Effekte des Typ IFN Rezeptors auf die IL-12p40 Expression ergeben. Durch die Verwendung verschiedener Zelloberflächenmarker (CD11c, CD11b, CD8 α , B220 und mPDCA-1) zur Klassifizierung der Zellen konnten vier Hauptgruppen unterschieden werden. Diese Gruppen waren CD11c⁻ CD11b⁺ Monozyten, CD11c⁺ CD11b⁺ cDCs, CD11c⁺ CD8 α ⁺ cDCs und CD11c^{int} B220⁺ mPDCA-1⁺ pDCs. Im Falle der akuten Infektion mit LCMV konnten CD8 α ⁺ cDCs bzw pDCs als Hauptzytokinproduzenten identifiziert werden. Während die absolute Anzahl an IL-12p40/GFP⁺ Zellen in allen IFNAR1-defizienten Populationen gesteigert war, zeigten die Zahlen für die IFN β /YFP⁺ Zellen einen Rückgang in IFNAR1^{-/-} Mäusen. Die Kohorte der doppelt positiven Zellen nach LCMV Infektion zeigte eine Steigerung innerhalb der IFNAR1^{-/-} CD8 α ⁺ cDC Subpopulation, während die die pDC Population in der Knockout reduzierte Zellzahlen aufwies.

Für die Stimulation mit poly(I:C) konnte eine Population als zelluläre Hauptquelle der IL-12p40 und IFN β Expression ermittelt werden und zwar die CD8 α ⁺ cDCs, die sowohl für die Zytokin-einzel positiven, als auch die doppelt positiven Zellen eine IFNAR1-Abhängigkeit aufwiesen. Während nach Stimulation mit CpG im WT vergleichbare Zahlen an IL-12p40/GFP⁺ Zellen in beiden cDC Subpopulationen ermittelt werden konnten, zeigten die CD11b⁺ cDCs eine deutliche Zunahme der Expression in IFNAR1-defizienten Mäusen, bei gleichbleibender Anzahl an CD8 α ⁺ cDCs. Wie auch nach LCMV wiesen die pDCs eine gesteigerte IL-12p40/GFP Expression auf. Für IFN β /YFP wurden die pDCs als Hauptquelle der Zytokinproduktion nach CpG-Stimulation identifiziert. Die zuvor als potente IL-12p40-produzierenden Zellen beschriebenen CD11b⁺ cDCs spielten in Bezug auf die IFN β Produktion keine Rolle und auch die Expression durch CD8 α ⁺ cDCs war

vergleichsweise gering. Ein Unterschied zwischen IFNAR1^{+/+} und IFNAR1^{-/-} Mäusen konnte hier nicht gezeigt werden.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Quelle der Zytokinproduktion abhängig vom Signalweg der erkannten PAMPs sein könnte. Die unterschiedlichen cDC Subpopulationen können verschiedene PAMPs erkennen und dadurch die Aktivierung der T Zellen und ihre Differenzierung spezifisch beeinflussen (Huang *et al.* 2001). Nach viraler Infektion mit MCMV, nicht aber mit LCMV, konnte eine Subpopulation CD8 α ⁺ Ly6G/C⁺ CD11b⁻ DCs, die als pDCs charakterisiert wurden, als exklusive Hauptproduzenten für IFN β und IL-12 beschrieben werden (Dalod *et al.* 2002). Die Expression von IL-12 war hier IFNAR-unabhängig, was anhand der MFI einer intrazellulären Färbung für IL-12 gezeigt wurde. In einer anderen Studie wurde die mRNA-Expression verschiedener Zytokine der angeborenen Immunantwort nach MCMV untersucht und auch hier zeigten sich die pDCs als Hauptquelle sowohl der Typ I IFN Antwort als auch der IL-12 Expression (Zucchini *et al.* 2008).

4.1.5 IFN β -produzierende pDCs zeigen eine selektive Apoptose in Abhängigkeit vom Typ I IFN Signalweg, während die IL-12p40 Produktion konstant bleibt

Die phänotypische Charakterisierung der Zytokin-produzierenden Zellen brachte nicht nur neue Erkenntnisse über die zelluläre Quelle von IL-12 und IFN β , simultan gemessen mit Hilfe eines Doppel-Reportermausmodell, es konnte auch gezeigt werden, dass der Typ I IFN Rezeptor nach akuter viraler Infektion die Expression von IL-12p40 negativ moduliert. Die Anzahl der IL-12p40-produzierenden Zellen war in allen IFNAR1-defizienten Subpopulationen nach LCMV Infektion gesteigert. Die Analyse der relativen und absoluten Zellzahlen für cDCs und pDCs in der Milz der LCMV infizierten Tiere ergab eine gesteigerte Anzahl der gesamten cDC Population in IFNAR1^{-/-} Mäusen, wohingegen die pDCs in ihrer Anzahl in den IFNAR1^{-/-} Mäusen reduziert waren. Diese Ergebnisse gingen einher mit einer erhöhten Apoptoserate der pDCs. Interessanterweise waren die verbleibenden pDCs in der Lage, die IL-12p40 Expression bezogen auf die Gesamtpopulation an pDCs konstant zu halten. Während die gesteigerte Ex-

pression innerhalb der cDC Subpopulationen also auf eine Zunahme der Zellzahl zurückzuführen ist, erhöhte sich die Menge an produziertem Zytokin ausgehend von den noch messbaren pDCs. Im Zusammenhang mit viralen Stimuli konnte bereits gezeigt werden, dass pDCs sowohl Typ I IFNs als auch sehr potent IL-12 exprimieren, außerdem sind sie Zielzellen produktiver viraler Replikation während einer Infektion mit dem LCMV Klone 13 Stamm (Macal *et al.* 2012). Dies könnte die Hypothese stützen, dass eine akute LCMV Infektion zum selektiven Zelltod IFN β -produzierender pDCs führen könnte, und damit auch den Rückgang der messbaren IFN β -Level in der Milz erklären. Um hier eine genauere Aussage treffen zu können, müsste die Zytokinmenge innerhalb der produzierenden pDCs bestimmt werden. Obwohl die IL-12p40-Level in der Milz von IFNAR1^{-/-} Mäusen gesteigert war, war die virale Last hier signifikant erhöht, deshalb stellt sich die Frage, ob die hohe IL-12p40-Konzentration überhaupt funktionell ist oder nur das Resultat einer höheren Immunaktivierung durch unkontrollierte Virusvermehrung. Die selektive Apoptose IFN β -produzierender pDCs in IFNAR1^{-/-} Mäusen könnte möglicherweise ein LCMV-spezifisches Phänomen sein, da dies beispielsweise nicht im Kontext einer HSV-1 Infektion gezeigt werden konnte. In WT Mäuse infiziert mit MCMV oder VSV dagegen trugen Typ I IFNs zu einem Rückgang der pDC Zahlen in der frühen Phase nach Infektion (Swiecki *et al.* 2011). Ein Einfluss eventueller virale Persistenz kann hier ausgeschlossen werden, zum einen wurde in dieser Arbeit ein LCMV Stamm verwendet, der eine akute Infektion auslöst und zum anderen können andere LCMV Stämme, HSV-1 oder MCMV zwar zu einer Persistenz im Wirt führen, VSV hingegen löst in Säugerzellen eine akute Infektion aus ohne Übergang in eine latente Phase. Vielmehr deuten die analysierten Zeitpunkte eher auf einen Faktor während der akuten Phase hin.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen erstmalig die Analyse und Charakterisierung simultan IFN β und IL12 produzierender Zellen auf Einzelzellebene in einem komplexen viralen Infektionsmodell und geben Hinweise auf die möglichen Effekte des Typ I IFN Signalweges auf die Expression von IL-12.

4.2 Visualisierung von IFN β und seine Effekte in der ZNS Autoimmunität

Es ist unumstritten, dass IFN β eine protektive Rolle in inflammatorischen Prozessen innerhalb des zentralen Nervensystems sowohl im Menschen als auch im Tiermodell hat (Teige *et al.* 2003, Prinz *et al.* 2008, Paty und Li 1993). Es ist Forschern bereits gelungen, im Tiermodell gewonnene Ergebnisse erfolgreich auf die Therapie der MS im Menschen zu übertragen. Allerdings sind seine Effekte und die Mechanismen dahinter immer noch nicht vollständig aufgeklärt.

Innerhalb dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass IFN β am Höhepunkt des Krankheitsverlaufs im EAE-Tiermodell in erster Linie von Mikroglia innerhalb aktiver Läsionen im ZNS Gewebe exprimiert wird. Weiter konnte gezeigt werden, dass Mikroglia potente IFN β Produzenten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* sind. Dabei spielte es keine Rolle ob die Induktion durch die Entzündungsreaktion selber oder aber mittels Stimulation durch pathogen-assoziierte molekulare Liganden hervorgerufen wurde.

4.2.1 Phänotypische Charakterisierung der zellulären Quelle von IFN β während der EAE mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz Färbung

Bereits publizierten Befunde beschreiben eine protektive Rolle von IFN β im EAE Modell, gezeigt in Verlaufsstudien der klinischen Scorewerte von WT gegenüber IFN $\beta^{-/-}$ oder IFNAR1 $^{-/-}$ Tieren. Dabei konnte eine IFN β Expression lediglich am Höhepunkt der Krankheit im ZNS lokalisiert werden (Teige *et al.* 2003, Prinz *et al.* 2008). Bisher gibt es keine Daten, die einen Vergleich zwischen Peripherie und ZNS, den zeitlichen Verlauf oder die zelluläre Quelle der IFN β Expression in der EAE beschreiben. Um neue Erkenntnisse zur IFN β Produktion im Verlauf der EAE zu erlangen, wurden im zeitlichen Verlauf der EAE in C57BL/6 Mäusen die Induktion von IFN β mRNS zwischen Peripherie und ZNS miteinander verglichen. Als repräsentatives Organ für die Peripherie diente die Milz, das Rückenmark wurde repräsentativ für das ZNS untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten zum ersten Mal, dass es innerhalb der Peripherie nur in der Induktionsphase zwischen Tag 3-7 IFN β nachweisbar war, während im ZNS ab der Induktions-

phase die IFN β Expression stetig anstieg und ihren Höhepunkt an Tag 14-17, parallel zu den klinischen Scorewerten der untersuchten Tiere, erreichte. Der Induktionsverlauf des IFN-stimulierten Gens ISG56 zeigte dabei einen vergleichbaren Verlauf wie der der IFN β mRNA. Die Ergebnisse stützen damit die bereits gezeigten Ergebnisse von Prinz und Kollegen und zeigen deutlich, dass IFN β während des Krankheitsverlaufs der EAE und vor allem am Höhepunkt ausschließlich im ZNS produziert wird (Prinz *et al.* 2008). Die in der Peripherie gemessene mRNA kann durch die Immunisierung selbst hervorgerufen worden sein, da in Kontrolle-Tieren, die nur mit dem Adjuvans behandelt worden sind, ebenfalls eine frühe Induktion messbar war. Grund dafür können die im CFA enthaltenen hitzeinaktivierten *M. tuberculosis* sein, die durch APZs erkannt und prozessiert werden und damit eine Immunreaktion in den Lymphknoten oder der Milz auslösen. Andererseits könnte eine frühe Typ I IFN Antwort in der Peripherie dem Entstehen der EAE, also dem Übergang von der Induktions- in die Effektorphase, auch entgegenwirken. Das würde erklären, warum nicht alle immunisierten Tiere gleich starke bzw. in selteneren Fällen keine Symptome entwickeln. Der Vergleich zwischen Gehirn (Daten hier nicht gezeigt) und Rückenmark deutet darauf hin, dass das Rückenmark der Hauptwirkungsort während der EAE war, da hier die höheren Werte an IFN β gemessen werden konnten. Zum einen migrieren die Zellen, wie APZs und autoreaktive T Zellen, in das ZNS ein. Dies wird durch die Verabreichung vom PTX begünstigt, das die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke erhöht. Des Weiteren könnten ZNS residente Zellen, die in der Lage sind Typ I IFN zu exprimieren, zur IFN β Produktion beitragen. Die Induktion könnte zum einen durch die Erkennung von Antigenen der immigrierten Zellen oder aber durch DNS-Abbauprodukte, die von apoptotischen Zellen stammen und als mikrobielle Liganden agieren, ausgelöst werden (Yasuda *et al.* 2005). Trotz dieser Befunde blieb die Frage zur zellulären Quelle der IFN β Produktion zu diesem Zeitpunkt unbeantwortet. Während nach viraler Infektion Neurone als Quelle von Typ I IFN beschrieben wurden, wurden DCs als perivaskuläre Zellen peripheren Ursprungs beschrieben, die jedoch nicht als Typ IFN Produzenten nachgewiesen wurden, und pDCs waren innerhalb des Parenchyms gar nicht nachweisbar (Delhaye *et al.* 2006, Greter *et al.* 2005, Serafini *et al.* 2000).

Nachdem IFN β auf RNS-Ebene insgesamt innerhalb des ZNS lokalisiert werden konnte, sollten weitere Experimente Aufschluss über die zelluläre Quelle der Expression geben. Dazu wurden mononukleäre Zellen aus dem Rückenmark von EAE-immunisierten Tieren an Tag 17, also am Höhepunkt der Erkrankung, isoliert und auf die Zelloberflächenmarker CD45 und CD11b hin sortiert. Die Analyse der mRNA Induktion zeigte deutlich, dass IFN β hauptsächlich innerhalb der CD45^{int} CD11b⁺ Zellpopulation, die sich zum größten Teil aus Mikroglia zusammensetzt, exprimiert wird (Imai *et al.* 1996). Die CD45^{high} CD11b⁺ Zellpopulation, die sich aus immigrierten DCs und M Φ s zusammensetzt, zeigte eine nur gering messbare Induktion. Generell handelte es sich hier aber um Zellpopulationen von denen bekannt ist, dass sie zur IFN Produktion fähig sind (Scheu *et al.* 2008). Khorrooshi und Kollegen beschrieben in ihrer Studie die Typ I IFN Expression nach intrathekaler Injektion von poly(I:C) durch die gleiche Zellpopulation (CD45⁺ CD11b⁺) im Bereich der Hirnhaut und des choroidalen Plexus (Khorrooshi *et al.* 2015).

Um die intrinsische Fähigkeit dieser Zellen IFN zu produzieren weiter zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Modell zur Kultivierung von primären adulten Mikroglia aus dem ZNS genutzt (Ponomarev *et al.* 2005). Zum durchflusszytometrischen Nachweis der IFN β Expression auf Einzelzellebene wurden die Zellen aus IFN β ^{mob/mob} Reportermausen isoliert, mit Hilfe verschiedener pathogen-assoziiertes molekularer Liganden stimuliert und mit WT Zellen verglichen. Die Zellen wurden über die Expression von CD45 und CD11b als Mikroglia charakterisiert und die IFN β Antwort über die Detektion des YFP-Reporterproteins ermittelt. Während die Stimulation mit den Liganden CpG2216 (TLR9), LPS (TLR4) und Pam3CSK4 (TLR2) kein YFP Signal lieferten, konnten nach Stimulation mit poly(I:C) bis zu 10% IFN β /YFP⁺ Zellen gemessen werden, obwohl die Zellen, außer nach CpG2216, eine Aktivierung aufwiesen. Auch die Analyse mittels Immunfluoreszenzmikroskopie lieferte vergleichbare Frequenzen an IFN β /YFP⁺ Zellen. Eine Kofärbung von YFP mit dem Mikrogliamarker Iba1 bestätigte den Phänotyp der Zytokin-produzierenden Zellen und die Kofärbung mit TLR3 verifizierte, dass diese Zellen in der Lage sind poly(I:C) zu erkennen. Über eine qRT-PCR Untersuchung von IFN β /YFP positiv und negativ sortierter Zellen zur mRNA Expression der intrazellulären Rezeptoren MDA-5 und RIG-I in IFN β Produzenten

verglichen zu den Nicht-Produzenten konnte die Responsivität dieser Zellen auf poly(I:C) weiter unterstrichen werden. Was in dieser Arbeit für adulte Mikroglia-Kulturen gezeigt werden konnte, konnte auch für neonatalen Mikroglia auf mRNA Ebene nach poly(I:C) gezeigt werden und auch, dass diese Zellen die TLRs 1-9 exprimieren, also in der Lage sind auf verschiedene mikrobielle Stimuli zu reagieren (Town *et al.* 2006, Olson und Miller 2004). Nachdem die IFN β -produzierenden Zellen als Subpopulation aktivierter Mikroglia hämatopoetischen Ursprungs identifiziert werden konnten und die intrinsische Fähigkeit zur Zytokinproduktion dieser Zellen *in vitro* nachgewiesen werden konnte, lag der Fokus zunächst auf der Lokalisation dieser Zellen innerhalb des ZNS.

4.2.2 IFN β -produzierenden Zellen und ihre Lokalisation innerhalb des ZNS am Höhepunkt der EAE und *in situ* in organotypischen zerebellären Schnittkulturen

Da das Rückenmark durch eine höhere Expression von IFN β mRNA, verglichen zum Gehirn, als Hauptort der Immunantwort am Höhepunkt der EAE beschrieben werden konnte, wurden die histologischen Untersuchungen zunächst in Rückenmark-Schnitten von EAE-immunisierten IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Reporter-mäusen durchgeführt. Die immunhistologische Lokalisation der IFN β /YFP Produzenten innerhalb des ZNS an Tag 17 nach Immunisierung deutete auf eine spezifische Positionierung in Bereichen mit hoher Zellinfiltration hin. Diese Zellinfiltrate sind charakteristisch für Läsionen. Die Färbung von Myelin durch Luxol Fast Blue und die damit nachweisbaren demyelinisierten Bereiche bestätigten dies. Außerhalb von Läsionsbereichen konnte kein Signal für IFN β /YFP detektiert werden, was für eine spezifische Lokalisation der IFN β -produzierenden Zellen spricht. Da diese Ergebnisse aus Schnitten EAE-immunisierter adulter Tiere gewonnen wurden, konnte jedoch noch nicht beurteilt werden, ob die IFN β Produktion von residenten oder ins ZNS migrierten Zellen ausgeht. Für diese Untersuchung war die Verwendung eines weiteren Modells notwendig.

Zum Zweck der genaueren Charakterisierung der IFN β -produzierenden Zellen und um die Beteiligung nicht-hämatopoetischer Zellen zu untersuchen, wurde das *in situ* Modell organotypischer Schnittkulturen aus dem Zerebellum (OSCs) an-

gewendet, das ein robustes und gut reproduzierbares Modell darstellt. Unter Verwendung des IFN β ^{mob/mob} Reportermodell konnte gezeigt werden, dass nach *in situ* Stimulation mit poly(I:C) weder Astrozyten noch Neuronen sondern ausschließlich Mikroglia zur IFN β Produktion angeregt werden. Auch hier konnte die Responsivität gegenüber dem poly(I:C) erkennenden TLR3 und über Mac3 der Aktivierungszustand der Zellen nachgewiesen werden. Eine nur geringe Kollokalisation mit CCR2, einem Marker, der als selektiv für immigrierende Makrophagen beschrieben wurde (Saederup *et al.* 2010), unterstreicht hier, dass in diesem Modell vorwiegend ZNS residente Zellen zu finden sind und der Einfluss peripherer Immunantworten eine nur untergeordnete Rolle spielt. Dennoch kann für die *in vivo* Daten nicht ausgeschlossen werden, dass dort auch immigriert IFN β -produzierende myeloide Zellen messbar sind. Dafür könnte unter anderem die Induktion des Zytokins während der Induktionsphase innerhalb der Peripherie, die immunhistologisch nachgewiesene CCR2 Expression innerhalb der Gewebeschnitte aus dem Gehirn von EAE-immunisierten Mäusen und die gering messbare Induktion an IFN β mRNA innerhalb der CD45^{high} CD11b⁺ Population sprechen, in der DCs und M Φ s zu finden sind. Eine Beteiligung speziell von IFN β -produzierenden pDCs, wie es für die frühe Induktion in der Peripherie der Fall sein könnte, kann hier ausgeschlossen werden, da diese den Oberflächenmarker CD11b nicht exprimieren (Bauer *et al.* 2016, Scheu *et al.* 2008).

Der zufällige Befund, dass IFN β -produzierende Zellen in Bereichen mit erhöhtem Anteil an Myelintrümmern akkumulierten, also in Arealen, die durch spontane Demyelinisierung durch den mechanischen Stress bei der Präparation der OSCs hervorgerufen wurde, deutet auf eine mögliche funktionelle Rolle der IFN β -produzierenden Zellen innerhalb von demyelinisiertem Gewebe im ZNS hin.

4.2.3 Der Einfluss von IFN β auf phagozytotische Prozesse im ZNS und den Abbau von Myelin Debris innerhalb organotypischer zerebellärer Schnittkulturen

Die Lokalisation der IFN β /YFP⁺ Mikroglia innerhalb der poly(I:C) stimulierten OSCs war ein erster Hinweis auf eine spezifische Assoziation in demyelinisierten Bereichen. Um diesen Befund weiter zu untersuchen wurde in den OSCs mittels

einer LPC Behandlung eine Demyelinisierung hervorgerufen (Birgbauer *et al.* 2004). Diese Behandlung bewirkt eine nachweisbare Zerstörung der neuronalen Strukturen, immunhistologisch dargestellt über die Kofärbung von MBP mit NF-M. Eine Behandlung von *in vitro* generierten Mikroglia mit rIFN β offenbarte ein Lokalisationsmuster in engem Kontakt mit Myelin Debris nach Transplantation auf LPC-behandelte OSCs aus PLP-EGFP Mäusen. Weitere Untersuchungen auf mRNA Ebene zeigten zudem, dass *in vitro* generierte mit rIFN β stimulierte Mikroglia aus WT und IFN β ^{-/-} Mäusen eine Induktion verschiedener Phagozytose-assoziiierter Gene aufwiesen, die in IFNAR1^{-/-} Zellen nicht messbar war. Damit war der erste Hinweis gegeben, dass die phagozytotische Kapazität von Mikroglia IFN β -abhängig ist.

Es konnte weiter gezeigt werden, dass nicht nur die generelle Kapazität, sondern vielmehr speziell die Phagozytose von Myelin Debris und deren Effizienz abhängig von IFN β und dem IFNAR1 ist. Unterstützend dazu stehen Daten von TRIF^{-/-} Mikroglia-Kulturen, deren Kapazität axonale Debris zu phagozytieren reduziert war, ihre phagozytotische Effizienz aber durch die Aktivierung Interferon-stimulierter Gene gesteigert werden konnte. Dies lässt vermuten, dass auch die Phagozytose von abgebauten Myelin Debris wichtig für die Neuroregeneration ist, da Neurone ihren Wachstumsprozess sofort einstellen wenn sie auf Rückstände apoptotischer Neurone treffen (Hosmane *et al.* 2012).

Die Behandlung mit IFN β induzierte nicht nur die Phagozytose von Myelin durch *in vitro* generierte Mikroglia, sondern reduzierte auch den Anteil an Myelin Debris innerhalb LPC-demyelinisierter OSCs. Keiner dieser Befunde traf auf IFNAR1^{-/-} Zellen oder OSCs zu, was dem Signalweg über den Rezeptor eine bedeutende Rolle in der Beseitigung von Myelin Debris zukommen lässt. Dafür sprechen auch die Daten einer kürzlich publizierten Studie, in der die intrathekale Injektion von poly(I:C) in EAE-immunisierte Mäuse mit dem Auftreten erster klinischer Symptome die Verschlimmerung des Krankheitsverlaufs unterdrückte, so lange IFN β exprimiert wurde, während diese Effekte in den IFNAR1^{-/-} ausblieb (Khoroshii *et al.* 2015). IFN β zeigte sowohl eine exogene als auch eine ZNS-endogene Wirkung auf die Beseitigung von Myelin Debris im Kontext demyelinisierender Prozesse. Die Ergebnisse, dass IFN β Produzenten verglichen zu Nicht-Produzenten den Abbau von Myelin innerhalb LPC-demyelinisierter OSCs indu-

zieren, unterstreichen die Beteiligung von Mikroglia als Instrumentatoren für den Abbau von Myelin Debris und ihre mögliche Rolle im Zusammenhang immunregulatorischer Prozesse zur Neuroregeneration.

Mit Hilfe der hier dargestellten Daten war es möglich, neue Einblicke in die Funktion von IFN β -produzierenden Zellen innerhalb demyelinisierender Prozesse im ZNS zu erlangen und diese als einen möglichen Ansatzpunkt für neue Therapien zu etablieren.

5 Klinische Relevanz und abschließende Anmerkungen

Mit Hilfe dieser Dissertation konnte die simultane Visualisierung der IFN β und IL-12p40 Zellen auf Einzelzellebene unter dem Einfluss des Typ I IFN Rezeptor Signalweges in einem komplexen viralen Infektionsmodell gezeigt und die Hauptproduzenten beider Zytokine identifiziert werden. Während von pDCs keine basale Expression von IL-12 ausging, wurden sie nach LCMV Infektion zu sehr potenten Produzenten abhängig vom IFNAR1 Signalweg, obwohl sie eine erhöhte Apoptoserate aufwiesen und ihre Anzahl deutlich reduziert war. Annexin V ist ein Marker für Apoptose, weitere Experimente hierzu sind aber nötig um die Hypothese zum selektiven Zelltod IFN β -produzierender pDCs weiter zu analysieren. Erste durchflusszytometrische Messungen verschiedener Caspasen mit Hilfe eines Pan-Caspase Markers (Daten hier nicht gezeigt) in cDCs und pDCs nach akuter LCMV Infektion deuten weiter in die Richtung, dass pDCs tatsächlich eine höhere Zelltodrate aufweisen. Ob die hohen Konzentrationen an IL-12p40 funktionell sind, könnte die Messung von IFN γ Aufschluss bringen. Außerdem muss die spezifische Lokalisation der IL-12p40 Produzenten weiter untersucht werden, um eine Aussage über die immunregulatorische Funktion dieser Zellen machen zu können.

Aufgrund limitierter experimenteller Möglichkeiten konnte in dieser Arbeit der Infektionsstatus der Zytokin-produzierenden Zellen durchflusszytometrisch nicht untersucht werden. Die zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Antikörper gegen virale Proteine des LCMV lagen nur in Fluoreszenzen vor, die im gleichen Kanal wie die Reporterproteine YFP oder GFP hätten gemessen werden können. Um dieses Problem zu umgehen, könnten die IFN β /YFP⁺ und IL-12p40/GFP⁺ sortiert werden und anschließend auf virale RNS hin untersucht werden.

Im Kontext der EAE konnte die Funktionalität der IFN β -produzierender Mikroglia charakterisiert werden und damit der Einfluss von IFN β auf den Abbau des durch inflammatorische Prozesse im ZNS entstehenden Myelin Debris untersucht werden. Hier konnten erstmals die IFN β -exprimierenden Zellen innerhalb aktiver Läsionen im ZNS Gewebe lokalisiert werden. Diese Ergebnisse liefern wichtige Hinweise auf die Bedeutung des Abbaus des Myelin Debris auf neuroregenerative Prozesse. In dieser Arbeit wurden keine Faktoren untersucht, die die Positionierung der Zellen innerhalb der demyelinisierten Bereiche begünstigen. Hier

könnten Untersuchungen zu Chemokinrezeptoren und chemotaktischen Liganden weitere Erkenntnisse liefern. Zwei Kandidaten könnten CCL2 und CXCL10 sein, die von Astrozyten exprimiert werden und für die Migration von Mikroglia oder MΦs in die Läsionsbereiche verantwortlich sein könnten (Tanuma *et al.* 2006, van Heteren *et al.* 2008). Um die Rolle der IFNβ-produzierenden Mikroglia und deren Effekte auf den Myelin Debris Abbau *in vivo* nachzuweisen, wäre der Transfer von IFNβ-Produzenten im Vergleich zu Nicht-Produzenten in EAE-immunisierte WT und IFNβ^{-/-} Mäuse ein experimenteller Ansatz. Außerdem sollten weitere histologische Analysen von Gewebeschnitten beider Genotypen durchgeführt werden. In den Untersuchungen dieser Arbeit ist es technisch noch nicht gelungen, IFNβ/YFP⁺ Zellen mit Mikroglia-typischen Markern wie Iba1 zu kolokalisieren. Außerdem sollte die zelluläre Zusammensetzung der für die Läsionen charakteristischen Zellinfiltrate näher untersucht werden, um den Einfluss und die Aufgabe von Neuronen, Astrozyten oder anderen Zellen, wie B Zellen in diesem Zusammenhang aufzuklären und eine Beteiligung dieser Zellen an der Expression von IFNβ ausschließen zu können. Diese Ergebnisse könnten dazu beitragen, Mikroglia zu möglichen Ansatzpunkten für therapeutische Ansätze zu nutzen und protektiv wirkendes IFNβ gezielter an seine Wirkorte zu positionieren.

6 Literaturverzeichnis

- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T. and Thanos, D. (2000). "Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter." *Cell* **103**(4): 667-678.
- Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T., *et al.* (2003). "Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos." *J Immunol* **171**(10): 4984-4989.
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W. and Rossi, F. M. (2007). "Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life." *Nat Neurosci* **10**(12): 1538-1543.
- Akiyama, H. and McGeer, P. L. (1990). "Brain microglia constitutively express beta-2 integrins." *J Neuroimmunol* **30**(1): 81-93.
- Aktas, O., Smorodchenko, A., Brocke, S., Infante-Duarte, C., Schulze Topphoff, U., Vogt, J., *et al.* (2005). "Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL." *Neuron* **46**(3): 421-432.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* **413**(6857): 732-738.
- Allt, G. and Lawrenson, J. G. (2001). "Pericytes: cell biology and pathology." *Cells Tissues Organs* **169**(1): 1-11.
- Archelos, J. J., Storch, M. K. and Hartung, H. P. (2000). "The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis." *Ann Neurol* **47**(6): 694-706.
- Ascherio, A. and Munch, M. (2000). "Epstein-Barr virus and multiple sclerosis." *Epidemiology* **11**(2): 220-224.
- Ascherio, A., Munger, K. L. and Lunemann, J. D. (2012). "The initiation and prevention of multiple sclerosis." *Nat Rev Neurol* **8**(11): 602-612.
- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., *et al.* (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." *Nat Immunol* **2**(12): 1144-1150.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Chemin, K., Boonstra, A., O'Garra, A., Vicari, A., *et al.* (2005). "Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration." *J Exp Med* **201**(7): 1157-1167.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J. J., Briere, F. and Trinchieri, G. (2003). "Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody." *J Immunol* **171**(12): 6466-6477.

Axtell, R. C., de Jong, B. A., Boniface, K., van der Voort, L. F., Bhat, R., De Sarno, P., *et al.* (2010). "T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis." *Nat Med* **16**(4): 406-412.

Barchet, W., Cella, M., Odermatt, B., Asselin-Paturel, C., Colonna, M. and Kalinke, U. (2002). "Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo." *J Exp Med* **195**(4): 507-516.

Barton, L. L. and Mets, M. B. (1999). "Lymphocytic choriomeningitis virus: pediatric pathogen and fetal teratogen." *Pediatr Infect Dis J* **18**(6): 540-541.

Bauer, J., Dress, R. J., Schulze, A., Dresing, P., Ali, S., Deenen, R., *et al.* (2016). "Cutting Edge: IFN-beta Expression in the Spleen Is Restricted to a Subpopulation of Plasmacytoid Dendritic Cells Exhibiting a Specific Immune Modulatory Transcriptome Signature." *J Immunol* **196**(11): 4447-4451.

Baxter, A. G. (2007). "The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis." *Nat Rev Immunol* **7**(11): 904-912.

Bernard, C. C. and Carnegie, P. R. (1975). "Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: immunologic response to mouse spinal cord and myelin basic proteins." *J Immunol* **114**(5): 1537-1540.

Birgbauer, E., Rao, T. S. and Webb, M. (2004). "Lysolecithin induces demyelination in vitro in a cerebellar slice culture system." *J Neurosci Res* **78**(2): 157-166.

Bogdan, C., Mattner, J. and Schleicher, U. (2004). "The role of type I interferons in non-viral infections." *Immunol Rev* **202**: 33-48.

Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., *et al.* (2009). "Origin of the lamina propria dendritic cell network." *Immunity* **31**(3): 513-525.

Boiko, A., Vorobeychik, G., Paty, D., Devonshire, V. and Sadovnick, D. (2002). "Early onset multiple sclerosis: a longitudinal study." *Neurology* **59**(7): 1006-1010.

Bolen, C. R., Robek, M. D., Brodsky, L., Schulz, V., Lim, J. K., Taylor, M. W., *et al.* (2013). "The blood transcriptional signature of chronic hepatitis C virus is consistent with an ongoing interferon-mediated antiviral response." *J Interferon Cytokine Res* **33**(1): 15-23.

Bradford, M., Schroeder, A., Morse, H. C., 3rd, Vogel, S. N. and Cowdery, J. S. (2002). "CpG DNA induced IL-12 p40 gene activation is independent of STAT1 activation or production of interferon consensus sequence binding protein." *J Biomed Sci* **9**(6 Pt 2): 688-696.

Buchanan, J. M., Vogel, L. A., Van Cleave, V. H. and Metzger, D. W. (1995). "Interleukin 12 alters the isotype-restricted antibody response of mice to hen eggwhite lysozyme." *Int Immunol* **7**(9): 1519-1528.

Byrnes, A. A., Ma, X., Cuomo, P., Park, K., Wahl, L., Wolf, S. F., *et al.* (2001). "Type I interferons and IL-12: convergence and cross-regulation among mediators of cellular immunity." *Eur J Immunol* **31**(7): 2026-2034.

Calabresi, P. A., Pelfrey, C. M., Tranquill, L. R., Maloni, H. and McFarland, H. F. (1997). "VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta." *Neurology* **49**(4): 1111-1116.

Chizzonite, R., Truitt, T., Desai, B. B., Nunes, P., Podlaski, F. J., Stern, A. S., *et al.* (1992). "IL-12 receptor. I. Characterization of the receptor on phytohemagglutinin-activated human lymphoblasts." *J Immunol* **148**(10): 3117-3124.

Cisse, B., Caton, M. L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., *et al.* (2008). "Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development." *Cell* **135**(1): 37-48.

Comi, G., Filippi, M., Barkhof, F., Durelli, L., Edan, G., Fernandez, O., *et al.* (2001). "Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study." *Lancet* **357**(9268): 1576-1582.

Cousens, L. P., Orange, J. S., Su, H. C. and Biron, C. A. (1997). "Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(2): 634-639.

Cousens, L. P., Peterson, R., Hsu, S., Dorner, A., Altman, J. D., Ahmed, R., *et al.* (1999). "Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection." *J Exp Med* **189**(8): 1315-1328.

Cserr, H. F. and Bundgaard, M. (1984). "Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach." *Am J Physiol* **246**(3 Pt 2): R277-288.

Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T. P., Henry, S. C., Hamilton, J. D., *et al.* (2003). "Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta." *J Exp Med* **197**(7): 885-898.

Dalod, M., Salazar-Mather, T. P., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Briere, F., *et al.* (2002). "Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo." *J Exp Med* **195**(4): 517-528.

Davidson, S., Crotta, S., McCabe, T. M. and Wack, A. (2014). "Pathogenic potential of interferon alphabeta in acute influenza infection." *Nat Commun* **5**: 3864.

de Weerd, N. A., Vivian, J. P., Nguyen, T. K., Mangan, N. E., Gould, J. A., Braniff, S. J., *et al.* (2013). "Structural basis of a unique interferon-beta signaling axis mediated via the receptor IFNAR1." *Nat Immunol* **14**(9): 901-907.

Decker, T., Muller, M. and Stockinger, S. (2005). "The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection." *Nat Rev Immunol* **5**(9): 675-687.

Delhaye, S., Paul, S., Blakqori, G., Minet, M., Weber, F., Staeheli, P., *et al.* (2006). "Neurons produce type I interferon during viral encephalitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(20): 7835-7840.

Desai, B. B., Quinn, P. M., Wolitzky, A. G., Mongini, P. K., Chizzonite, R. and Gately, M. K. (1992). "IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression." *J Immunol* **148**(10): 3125-3132.

Doughty, L. A., Carlton, S., Galen, B., Cooma-Ramberan, I., Chung, C. S. and Ayala, A. (2006). "Activation of common antiviral pathways can potentiate inflammatory responses to septic shock." *Shock* **26**(2): 187-194.

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Sheehan, K. C., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J. D., *et al.* (2005). "A critical function for type I interferons in cancer immunoediting." *Nat Immunol* **6**(7): 722-729.

Ebers, G. C., Yee, I. M., Sadovnick, A. D. and Duquette, P. (2000). "Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group." *Ann Neurol* **48**(6): 927-931.

Engelhardt, B. (2006). "Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier." *J Neural Transm (Vienna)* **113**(4): 477-485.

Erlandsson, L., Blumenthal, R., Eloranta, M. L., Engel, H., Alm, G., Weiss, S., *et al.* (1998). "Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts." *Curr Biol* **8**(4): 223-226.

Fazakerley, J. K., Southern, P., Bloom, F. and Buchmeier, M. J. (1991). "High resolution in situ hybridization to determine the cellular distribution of lymphocytic choriomeningitis virus RNA in the tissues of persistently infected mice: relevance to arenavirus disease and mechanisms of viral persistence." *J Gen Virol* **72** (Pt 7): 1611-1625.

Fitzgerald-Bocarsly, P. (2002). "Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells." *Biotechniques Suppl*: 16-20, 22, 24-19.

Fogg, D. K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D. R., *et al.* (2006). "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells." *Science* **311**(5757): 83-87.

Ford, A. L., Foulcher, E., Lemckert, F. A. and Sedgwick, J. D. (1996). "Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death." *J Exp Med* **184**(5): 1737-1745.

Fu, X. Y., Kessler, D. S., Veals, S. A., Levy, D. E. and Darnell, J. E., Jr. (1990). "ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(21): 8555-8559.

Gale, C. R. and Martyn, C. N. (1995). "Migrant studies in multiple sclerosis." *Prog Neurobiol* **47**(4-5): 425-448.

- Gautier, G., Humbert, M., Deauvieau, F., Scuiller, M., Hiscott, J., Bates, E. E., *et al.* (2005). "A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells." *J Exp Med* **201**(9): 1435-1446.
- Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D. A., Mowat, A. M. and Randolph, G. J. (2010). "Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity." *Nat Rev Immunol* **10**(6): 453-460.
- Ghosh, H. S., Cisse, B., Bunin, A., Lewis, K. L. and Reizis, B. (2010). "Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells." *Immunity* **33**(6): 905-916.
- Gi, M., Im, W. and Hong, S. (2009). "Dendritic cells as danger-recognizing biosensors." *Sensors (Basel)* **9**(9): 6730-6751.
- Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F. J., Stremlo, D. L., Familletti, P. C., *et al.* (1995). "Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist." *Eur J Immunol* **25**(1): 200-206.
- Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X. L., Trinchieri, G., *et al.* (2002). "The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." *J Exp Med* **195**(7): 953-958.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., *et al.* (2010). "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." *Science* **330**(6005): 841-845.
- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., *et al.* (2009). "The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs." *J Exp Med* **206**(13): 3115-3130.
- Gniadek, P., Aktas, O., Wandinger, K. P., Bellmann-Strobl, J., Wengert, O., Weber, A., *et al.* (2003). "Systemic IFN-beta treatment induces apoptosis of peripheral immune cells in MS patients." *J Neuroimmunol* **137**(1-2): 187-196.
- Gold, R., Lington, C. and Lassmann, H. (2006). "Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research." *Brain* **129**(Pt 8): 1953-1971.
- Gonzalez-Navajas, J. M., Fine, S., Law, J., Datta, S. K., Nguyen, K. P., Yu, M., *et al.* (2010). "TLR4 signaling in effector CD4+ T cells regulates TCR activation and experimental colitis in mice." *J Clin Invest* **120**(2): 570-581.
- Greter, M., Heppner, F. L., Lemos, M. P., Odermatt, B. M., Goebels, N., Laufer, T., *et al.* (2005). "Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis." *Nat Med* **11**(3): 328-334.
- Grohmann, U., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Orabona, C., Ayroldi, E., Fioretti, M. C., *et al.* (1998). "IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production." *Immunity* **9**(3): 315-323.

- Guilliams, M., Henri, S., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M., *et al.* (2010). "From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets." *Eur J Immunol* **40**(8): 2089-2094.
- Guo, B., Chang, E. Y. and Cheng, G. (2008). "The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice." *J Clin Invest* **118**(5): 1680-1690.
- Haller, O. and Kochs, G. (2002). "Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity." *Traffic* **3**(10): 710-717.
- Harris, L. D., Tabb, B., Sodora, D. L., Paiardini, M., Klatt, N. R., Douek, D. C., *et al.* (2010). "Downregulation of robust acute type I interferon responses distinguishes nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) infection of natural hosts from pathogenic SIV infection of rhesus macaques." *J Virol* **84**(15): 7886-7891.
- Hasan, U. A., Trinchieri, G. and Vlach, J. (2005). "Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts." *J Biol Chem* **280**(21): 20620-20627.
- Hedstrom, A. K., Akerstedt, T., Hillert, J., Olsson, T. and Alfredsson, L. (2011). "Shift work at young age is associated with increased risk for multiple sclerosis." *Ann Neurol* **70**(5): 733-741.
- Hemmer, B., Archelos, J. J. and Hartung, H. P. (2002). "New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis." *Nat Rev Neurosci* **3**(4): 291-301.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., *et al.* (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* **408**(6813): 740-745.
- Hespel, C. and Moser, M. (2012). "Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity." *Eur J Immunol* **42**(10): 2535-2543.
- Hickey, W. F., Hsu, B. L. and Kimura, H. (1991). "T-lymphocyte entry into the central nervous system." *J Neurosci Res* **28**(2): 254-260.
- Hildner, K., Edelson, B. T., Purtha, W. E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., *et al.* (2008). "Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity." *Science* **322**(5904): 1097-1100.
- Hoeffel, G. and Ginhoux, F. (2015). "Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages." *Front Immunol* **6**: 486.
- Hoffjan, S. and Akkad, D. A. (2010). "The genetics of multiple sclerosis: an update 2010." *Mol Cell Probes* **24**(5): 237-243.
- Hoffmann, S., Vitzthum, K., Mache, S., Spallek, M., Quarcoo, D., Groneberg, D. A., *et al.* (2009). Multiple Sklerose: Epidemiologie, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Praktische Arbeitsmedizin. Essen, Germany, Bundesverband selbstständiger Arbeitsmediziner und freiberuflicher Betriebsärzte BsAfB: 12-18.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., *et al.* (2005). "IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses." *Nature* **434**(7034): 772-777.

Honda, K., Yanai, H., Takaoka, A. and Taniguchi, T. (2005). "Regulation of the type I IFN induction: a current view." *Int Immunol* **17**(11): 1367-1378.

Hosmane, S., Tegenge, M. A., Rajbhandari, L., Uapinyoying, P., Kumar, N. G., Thakor, N., *et al.* (2012). "Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter inducing interferon-beta mediates microglial phagocytosis of degenerating axons." *J Neurosci* **32**(22): 7745-7757.

Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A. and Murphy, K. M. (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." *Science* **260**(5107): 547-549.

Huang, L. Y., Reis e Sousa, C., Itoh, Y., Inman, J. and Scott, D. E. (2001). "IL-12 induction by a TH1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10." *J Immunol* **167**(3): 1423-1430.

Hwang, S. Y., Hertzog, P. J., Holland, K. A., Sumarsono, S. H., Tymms, M. J., Hamilton, J. A., *et al.* (1995). "A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11284-11288.

Imai, Y., Iбата, I., Ito, D., Ohsawa, K. and Kohsaka, S. (1996). "A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage." *Biochem Biophys Res Commun* **224**(3): 855-862.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., *et al.* (1992). "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." *J Exp Med* **176**(6): 1693-1702.

Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957). "Virus interference. I. The interferon." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**(927): 258-267.

Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., *et al.* (2002). "Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets." *J Exp Med* **195**(11): 1507-1512.

Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." *Nat Immunol* **5**(10): 987-995.

Iwasaki, H. and Akashi, K. (2007). "Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell." *Immunity* **26**(6): 726-740.

Janeway, C. (1989). "Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0." *Immunol Today* **10**(9): 283-286.

Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. (2002). "Innate immune recognition." *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.

- Johnson, K. P., Brooks, B. R., Cohen, J. A., Ford, C. C., Goldstein, J., Lisak, R. P., *et al.* (1998). "Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group." *Neurology* **50**(3): 701-708.
- Kantarci, O. and Wingerchuk, D. (2006). "Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights." *Curr Opin Neurol* **19**(3): 248-254.
- Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T. and Grusby, M. J. (1996). "Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice." *Nature* **382**(6587): 174-177.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., *et al.* (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." *Nature* **441**(7089): 101-105.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* **11**(5): 373-384.
- Keppler, S. J., Rosenits, K., Koegl, T., Vucikujia, S. and Aichele, P. (2012). "Signal 3 cytokines as modulators of primary immune responses during infections: the interplay of type I IFN and IL-12 in CD8 T cell responses." *PLoS One* **7**(7): e40865.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M. and Verkhratsky, A. (2011). "Physiology of microglia." *Physiol Rev* **91**(2): 461-553.
- Khorooshi, R., Morch, M. T., Holm, T. H., Berg, C. T., Dieu, R. T., Draeby, D., *et al.* (2015). "Induction of endogenous Type I interferon within the central nervous system plays a protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Acta Neuropathol* **130**(1): 107-118.
- Ko, H. J., Brady, J. L., Ryg-Cornejo, V., Hansen, D. S., Vremec, D., Shortman, K., *et al.* (2014). "GM-CSF-responsive monocyte-derived dendritic cells are pivotal in Th17 pathogenesis." *J Immunol* **192**(5): 2202-2209.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., *et al.* (1989). "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." *J Exp Med* **170**(3): 827-845.
- Kochs, G., Bauer, S., Vogt, C., Frenz, T., Tschopp, J., Kalinke, U., *et al.* (2010). "Thogoto virus infection induces sustained type I interferon responses that depend on RIG-I-like helicase signaling of conventional dendritic cells." *J Virol* **84**(23): 12344-12350.
- Kocur, M., Schneider, R., Pulm, A. K., Bauer, J., Kropp, S., Gliem, M., *et al.* (2015). "IFN β secreted by microglia mediates clearance of myelin debris in CNS autoimmunity." *Acta Neuropathol Commun* **3**: 20.

- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T. R., *et al.* (2007). "Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation." *Nat Med* **13**(4): 423-431.
- Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." *Trends Neurosci* **19**(8): 312-318.
- Krug, A., Luker, G. D., Barchet, W., Leib, D. A., Akira, S. and Colonna, M. (2004). "Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9." *Blood* **103**(4): 1433-1437.
- Kurschus, F. C. (2015). "T cell mediated pathogenesis in EAE: Molecular mechanisms." *Biomed J* **38**(3): 183-193.
- Kurtzke, J. F. (1993). "Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection." *Clin Microbiol Rev* **6**(4): 382-427.
- Langmann, T. (2007). "Microglia activation in retinal degeneration." *J Leukoc Biol* **81**(6): 1345-1351.
- Lee, K. J., Perez, M., Pinschewer, D. D. and de la Torre, J. C. (2002). "Identification of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) proteins required to rescue LCMV RNA analogs into LCMV-like particles." *J Virol* **76**(12): 6393-6397.
- Liu, J., Guan, X., Tamura, T., Ozato, K. and Ma, X. (2004). "Synergistic activation of interleukin-12 p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein." *J Biol Chem* **279**(53): 55609-55617.
- Liu, K. and Nussenzweig, M. C. (2010). "Origin and development of dendritic cells." *Immunol Rev* **234**(1): 45-54.
- Liu, K., Vitoria, G. D., Schwickert, T. A., Guermonprez, P., Meredith, M. M., Yao, K., *et al.* (2009). "In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis." *Science* **324**(5925): 392-397.
- Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J. and Nussenzweig, M. (2007). "Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice." *Nat Immunol* **8**(6): 578-583.
- Liu, Y., Carlsson, R., Comabella, M., Wang, J., Kosicki, M., Carrion, B., *et al.* (2014). "FoxA1 directs the lineage and immunosuppressive properties of a novel regulatory T cell population in EAE and MS." *Nat Med* **20**(3): 272-282.
- Lomvardas, S. and Thanos, D. (2001). "Nucleosome sliding via TBP DNA binding in vivo." *Cell* **106**(6): 685-696.
- Lublin, F. D. and Reingold, S. C. (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." *Neurology* **46**(4): 907-911.

Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. and Iwasaki, A. (2003). "Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells." *J Exp Med* **198**(3): 513-520.

Macal, M., Lewis, G. M., Kunz, S., Flavell, R., Harker, J. A. and Zuniga, E. I. (2012). "Plasmacytoid dendritic cells are productively infected and activated through TLR-7 early after arenavirus infection." *Cell Host Microbe* **11**(6): 617-630.

Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., *et al.* (1995). "Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells." *J Immunol* **154**(10): 5071-5079.

Macatonia, S. E., Hsieh, C. S., Murphy, K. M. and O'Garra, A. (1993). "Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent." *Int Immunol* **5**(9): 1119-1128.

Manetti, R., Gerosa, F., Giudizi, M. G., Biagiotti, R., Parronchi, P., Piccinni, M. P., *et al.* (1994). "Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones." *J Exp Med* **179**(4): 1273-1283.

Marrie, R. A. (2004). "Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology." *Lancet Neurol* **3**(12): 709-718.

McGavern, D. B., Homann, D. and Oldstone, M. B. (2002). "T cells in the central nervous system: the delicate balance between viral clearance and disease." *J Infect Dis* **186 Suppl 2**: S145-151.

Mebius, R. E. and Kraal, G. (2005). "Structure and function of the spleen." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 606-616.

Mets, M. B., Barton, L. L., Khan, A. S. and Ksiazek, T. G. (2000). "Lymphocytic choriomeningitis virus: an underdiagnosed cause of congenital chorioretinitis." *Am J Ophthalmol* **130**(2): 209-215.

Mikaeloff, Y., Caridade, G., Tardieu, M. and Suissa, S. (2007). "Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children." *Brain* **130**(Pt 10): 2589-2595.

Muller, S., Hunziker, L.,ENZLER, S., Buhler-Jungo, M., Di Santo, J. P., Zinkernagel, R. M., *et al.* (2002). "Role of an intact splenic microarchitecture in early lymphocytic choriomeningitis virus production." *J Virol* **76**(5): 2375-2383.

Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S. and Ascherio, A. (2006). "Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis." *JAMA* **296**(23): 2832-2838.

Naik, S. H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M., *et al.* (2006). "Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes." *Nat Immunol* **7**(6): 663-671.

- Nansen, A. and Randrup Thomsen, A. (2001). "Viral infection causes rapid sensitization to lipopolysaccharide: central role of IFN-alpha beta." *J Immunol* **166**(2): 982-988.
- Nelissen, I., Ronsse, I., Van Damme, J. and Opdenakker, G. (2002). "Regulation of gelatinase B in human monocytic and endothelial cells by PECAM-1 ligation and its modulation by interferon-beta." *J Leukoc Biol* **71**(1): 89-98.
- Ng, C. T., Sullivan, B. M., Teijaro, J. R., Lee, A. M., Welch, M., Rice, S., *et al.* (2015). "Blockade of interferon Beta, but not interferon alpha, signaling controls persistent viral infection." *Cell Host Microbe* **17**(5): 653-661.
- Noseworthy, J. H. (1993). "Clinical trials in multiple sclerosis." *Curr Opin Neurol Neurosurg* **6**(2): 209-215.
- Odermatt, B., Eppler, M., Leist, T. P., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (1991). "Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(18): 8252-8256.
- Olerup, O. and Hillert, J. (1991). "HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation." *Tissue Antigens* **38**(1): 1-15.
- Olson, J. K. and Miller, S. D. (2004). "Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs." *J Immunol* **173**(6): 3916-3924.
- Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M. A., Ohteki, T., Jarrossay, D. and Manz, M. G. (2007). "Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow." *Nat Immunol* **8**(11): 1207-1216.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., *et al.* (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." *Immunity* **13**(5): 715-725.
- Orange, J. S. and Biron, C. A. (1996). "An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections." *J Immunol* **156**(3): 1138-1142.
- Ousman, S. S. and Kuberski, P. (2012). "Immune surveillance in the central nervous system." *Nat Neurosci* **15**(8): 1096-1101.
- Paintlia, M. K., Paintlia, A. S., Singh, A. K. and Singh, I. (2011). "Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis." *J Neurochem* **116**(4): 508-521.
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., *et al.* (2002). "A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R." *J Immunol* **168**(11): 5699-5708.

Parker, J. C., Igel, H. J., Reynolds, R. K., Lewis, A. M., Jr. and Rowe, W. P. (1976). "Lymphocytic choriomeningitis virus infection in fetal, newborn, and young adult Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*)." *Infect Immun* **13**(3): 967-981.

Paty, D. W. and Li, D. K. (1993). "Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group." *Neurology* **43**(4): 662-667.

Pestka, S., Krause, C. D. and Walter, M. R. (2004). "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors." *Immunol Rev* **202**: 8-32.

Pette, M., Pette, D. F., Muraro, P. A., Farnon, E., Martin, R. and McFarland, H. F. (1997). "Interferon-beta interferes with the proliferation but not with the cytokine secretion of myelin basic protein-specific, T-helper type 1 lymphocytes." *Neurology* **49**(2): 385-392.

Poltorak, M. P. and Schraml, B. U. (2015). "Fate mapping of dendritic cells." *Front Immunol* **6**: 199.

Ponomarev, E. D., Novikova, M., Maresz, K., Shriver, L. P. and Dittel, B. N. (2005). "Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state." *J Immunol Methods* **300**(1-2): 32-46.

Prchal, M., Pilz, A., Simma, O., Lingnau, K., von Gabain, A., Strobl, B., *et al.* (2009). "Type I interferons as mediators of immune adjuvants for T- and B cell-dependent acquired immunity." *Vaccine* **27 Suppl 6**: G17-20.

Presky, D. H., Yang, H., Minetti, L. J., Chua, A. O., Nabavi, N., Wu, C. Y., *et al.* (1996). "A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 14002-14007.

Prinz, M. and Priller, J. (2014). "Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease." *Nat Rev Neurosci* **15**(5): 300-312.

Prinz, M., Schmidt, H., Mildner, A., Knobloch, K. P., Hanisch, U. K., Raasch, J., *et al.* (2008). "Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system." *Immunity* **28**(5): 675-686.

Ransohoff, R. M. and Engelhardt, B. (2012). "The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system." *Nat Rev Immunol* **12**(9): 623-635.

Ransohoff, R. M., Kivisakk, P. and Kidd, G. (2003). "Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system." *Nat Rev Immunol* **3**(7): 569-581.

Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P. and Gardner, M. B. (1974). "Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)." *Cancer* **33**(4): 1027-1033.

- Rayamajhi, M., Humann, J., Penheiter, K., Andreasen, K. and Lenz, L. L. (2010). "Induction of IFN- α enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- γ ." *J Exp Med* **207**(2): 327-337.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., *et al.* (2009). "C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE." *Nat Immunol* **10**(5): 514-523.
- Reinhardt, R. L., Hong, S., Kang, S. J., Wang, Z. E. and Locksley, R. M. (2006). "Visualization of IL-12/23p40 in vivo reveals immunostimulatory dendritic cell migrants that promote Th1 differentiation." *J Immunol* **177**(3): 1618-1627.
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R. N., *et al.* (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas." *J Exp Med* **186**(11): 1819-1829.
- Reizis, B. (2010). "Regulation of plasmacytoid dendritic cell development." *Curr Opin Immunol* **22**(2): 206-211.
- Reynolds, J. M., Pappu, B. P., Peng, J., Martinez, G. J., Zhang, Y., Chung, Y., *et al.* (2010). "Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease." *Immunity* **32**(5): 692-702.
- Rieckmann, P. and Toyka, K. V. (2002). "[Immunomodulatory staged therapy of multiple sclerosis. New aspects and practical applications, March 2002]." *Nervenarzt* **73**(6): 556-563.
- Rogge, L., Barberis-Maino, L., Biffi, M., Passini, N., Presky, D. H., Gubler, U., *et al.* (1997). "Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells." *J Exp Med* **185**(5): 825-831.
- Rosche, B., Kieseier, B., Hartung, H. P. and Hemmer, B. (2003). "[New understanding of the immunopathogenesis of multiple sclerosis]." *Nervenarzt* **74**(8): 654-663.
- Saederup, N., Cardona, A. E., Croft, K., Mizutani, M., Coteleur, A. C., Tsou, C. L., *et al.* (2010). "Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice." *PLoS One* **5**(10): e13693.
- Sanjabi, S., Hoffmann, A., Liou, H. C., Baltimore, D. and Smale, S. T. (2000). "Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12705-12710.
- Sapozhnikov, A., Fischer, J. A., Zaft, T., Krauthgamer, R., Dzionek, A. and Jung, S. (2007). "Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells." *J Exp Med* **204**(8): 1923-1933.

Scheu, S., Dresing, P. and Locksley, R. M. (2008). "Visualization of IFN β production by plasmacytoid versus conventional dendritic cells under specific stimulation conditions in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(51): 20416-20421.

Schwartzman, R. J., Simpkins, N., Alexander, G. M., Reichenberger, E., Ward, K., Lindenberg, N., *et al.* (2009). "High-dose cyclophosphamide in the treatment of multiple sclerosis." *CNS Neurosci Ther* **15**(2): 118-127.

Schwentker, F. F. and Rivers, T. M. (1934). "The Antibody Response of Rabbits to Injections of Emulsions and Extracts of Homologous Brain." *J Exp Med* **60**(5): 559-574.

Scott, C. L., Bain, C. C., Wright, P. B., Sichien, D., Kotarsky, K., Persson, E. K., *et al.* (2015). "CCR2(+)CD103(-) intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T cells." *Mucosal Immunol* **8**(2): 327-339.

Sedaghat, A. R., German, J., Teslovich, T. M., Cofrancesco, J., Jr., Jie, C. C., Talbot, C. C., Jr., *et al.* (2008). "Chronic CD4+ T-cell activation and depletion in human immunodeficiency virus type 1 infection: type I interferon-mediated disruption of T-cell dynamics." *J Virol* **82**(4): 1870-1883.

Serafini, B., Columba-Cabezas, S., Di Rosa, F. and Aloisi, F. (2000). "Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis." *Am J Pathol* **157**(6): 1991-2002.

Shortman, K., Sathe, P., Vremec, D., Naik, S. and O'Keeffe, M. (2013). "Plasmacytoid dendritic cell development." *Adv Immunol* **120**: 105-126.

Shrikant, P. and Benveniste, E. N. (1996). "The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation." *J Immunol* **157**(5): 1819-1822.

Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A. and Neumann, H. (2013). "Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis." *Front Cell Neurosci* **7**: 6.

Skripuletz, T., Hackstette, D., Bauer, K., Gudi, V., Pul, R., Voss, E., *et al.* (2013). "Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination." *Brain* **136**(Pt 1): 147-167.

Sobottka, B., Ziegler, U., Kaech, A., Becher, B. and Goebels, N. (2011). "CNS live imaging reveals a new mechanism of myelination: the liquid croissant model." *Glia* **59**(12): 1841-1849.

Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H. and Schreiber, R. D. (1998). "How cells respond to interferons." *Annu Rev Biochem* **67**: 227-264.

Steinman, L. (2009). "A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis." *Nat Rev Immunol* **9**(6): 440-447.

Steinman, R. M. and Idoyaga, J. (2010). "Features of the dendritic cell lineage." *Immunol Rev* **234**(1): 5-17.

Steinman, R. M. and Witmer, M. D. (1978). "Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10): 5132-5136.

Stockinger, S., Materna, T., Stoiber, D., Bayr, L., Steinborn, R., Kolbe, T., *et al.* (2002). "Production of type I IFN sensitizes macrophages to cell death induced by *Listeria monocytogenes*." *J Immunol* **169**(11): 6522-6529.

Streit, W. J., Condeelis, J. R., Fendrick, S. E., Flanary, B. E. and Mariani, C. L. (2005). "Role of microglia in the central nervous system's immune response." *Neurol Res* **27**(7): 685-691.

Stuart, G. and Krikorian, K. S. (1933). "Neuroparalytic Accidents Complicating Antirabic Treatment." *Br Med J* **1**(3768): 501-504.

Sugamura, K., Ishii, N. and Weinberg, A. D. (2004). "Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40." *Nat Rev Immunol* **4**(6): 420-431.

Swanborg, R. H., Whittum-Hudson, J. A. and Hudson, A. P. (2002). "Human herpesvirus 6 and *Chlamydia pneumoniae* as etiologic agents in multiple sclerosis - a critical review." *Microbes Infect* **4**(13): 1327-1333.

Swanborg, R. H., Whittum-Hudson, J. A. and Hudson, A. P. (2003). "Infectious agents and multiple sclerosis--are *Chlamydia pneumoniae* and human herpes virus 6 involved?" *J Neuroimmunol* **136**(1-2): 1-8.

Swiecki, M., Wang, Y., Vermi, W., Gilfillan, S., Schreiber, R. D. and Colonna, M. (2011). "Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo." *J Exp Med* **208**(12): 2367-2374.

Takaoka, A. and Yanai, H. (2006). "Interferon signalling network in innate defence." *Cell Microbiol* **8**(6): 907-922.

Tanaka, N., Sato, M., Lamphier, M. S., Nozawa, H., Oda, E., Noguchi, S., *et al.* (1998). "Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells." *Genes Cells* **3**(1): 29-37.

Tanuma, N., Sakuma, H., Sasaki, A. and Matsumoto, Y. (2006). "Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis." *Acta Neuropathol* **112**(2): 195-204.

Teige, I., Liu, Y. and Issazadeh-Navikas, S. (2006). "IFN-beta inhibits T cell activation capacity of central nervous system APCs." *J Immunol* **177**(6): 3542-3553.

Teige, I., Treschow, A., Teige, A., Mattsson, R., Navikas, V., Leanderson, T., *et al.* (2003). "IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **170**(9): 4776-4784.

Teijaro, J. R., Ng, C., Lee, A. M., Sullivan, B. M., Sheehan, K. C., Welch, M., *et al.* (2013). "Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling." *Science* **340**(6129): 207-211.

Teles, R. M., Graeber, T. G., Krutzik, S. R., Montoya, D., Schenk, M., Lee, D. J., *et al.* (2013). "Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses." *Science* **339**(6126): 1448-1453.

Thanos, D., Du, W. and Maniatis, T. (1993). "The high mobility group protein HMG I(Y) is an essential structural component of a virus-inducible enhancer complex." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**: 73-81.

The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group (1996). "Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group." *Neurology* **47**(4): 889-894.

Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B. and Kono, D. H. (2005). "Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity." *Annu Rev Immunol* **23**: 307-336.

Thierfelder, W. E., van Deursen, J. M., Yamamoto, K., Tripp, R. A., Sarawar, S. R., Carson, R. T., *et al.* (1996). "Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells." *Nature* **382**(6587): 171-174.

Tian, J., Avalos, A. M., Mao, S. Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., *et al.* (2007). "Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE." *Nat Immunol* **8**(5): 487-496.

Tone, Y., Thompson, S. A., Babik, J. M., Nolan, K. F., Tone, M., Raven, C., *et al.* (1996). "Structure and chromosomal location of the mouse interleukin-12 p35 and p40 subunit genes." *Eur J Immunol* **26**(6): 1222-1227.

Town, T., Jeng, D., Alexopoulou, L., Tan, J. and Flavell, R. A. (2006). "Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3." *J Immunol* **176**(6): 3804-3812.

Tremblay, M. E., Lowery, R. L. and Majewska, A. K. (2010). "Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience." *PLoS Biol* **8**(11): e1000527.

Tremlett, H., Zhao, Y. and Devonshire, V. (2009). "Natural history comparisons of primary and secondary progressive multiple sclerosis reveals differences and similarities." *J Neurol* **256**(3): 374-381.

Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." *Nat Rev Immunol* **3**(2): 133-146.

Trinchieri, G., Santoli, D., Dee, R. R. and Knowles, B. B. (1978). "Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation." *J Exp Med* **147**(5): 1299-1313.

Trinchieri, G. and Sher, A. (2007). "Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence." *Nat Rev Immunol* **7**(3): 179-190.

Tsai, J. C. and Gildea, D. H. (2001). "Chlamydia pneumoniae and multiple sclerosis: no significant association." *Trends Microbiol* **9**(4): 152-154.

van Heteren, J. T., Rozenberg, F., Aronica, E., Troost, D., Lebon, P. and Kuijpers, T. W. (2008). "Astrocytes produce interferon-alpha and CXCL10, but not IL-6 or CXCL8, in Aicardi-Goutieres syndrome." *Glia* **56**(5): 568-578.

Varol, C., Landsman, L., Fogg, D. K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., *et al.* (2007). "Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells." *J Exp Med* **204**(1): 171-180.

Vignali, D. A. and Kuchroo, V. K. (2012). "IL-12 family cytokines: immunological playmakers." *Nat Immunol* **13**(8): 722-728.

Villares, R., Cadenas, V., Lozano, M., Almonacid, L., Zaballos, A., Martinez, A. C., *et al.* (2009). "CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues." *Eur J Immunol* **39**(6): 1671-1681.

Welsh, R. M. and Seedhom, M. O. (2008). "Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV): propagation, quantitation, and storage." *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 15**: Unit 15A 11.

Wherry, E. J., Ha, S. J., Kaech, S. M., Haining, W. N., Sarkar, S., Kalia, V., *et al.* (2007). "Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection." *Immunity* **27**(4): 670-684.

Wiesemann, E., Deb, M., Trebst, C., Hemmer, B., Stangel, M. and Windhagen, A. (2008). "Effects of interferon-beta on co-signaling molecules: upregulation of CD40, CD86 and PD-L2 on monocytes in relation to clinical response to interferon-beta treatment in patients with multiple sclerosis." *Mult Scler* **14**(2): 166-176.

Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C. J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., *et al.* (2005). "Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways." *J Immunol* **174**(10): 6129-6136.

Yen, J. H., Kong, W., Hooper, K. M., Emig, F., Rahbari, K. M., Kuo, P. C., *et al.* (2015). "Differential effects of IFN-beta on IL-12, IL-23, and IL-10 expression in TLR-stimulated dendritic cells." *J Leukoc Biol* **98**(5): 689-702.

Yu, Q., Kovacs, C., Yue, F. Y. and Ostrowski, M. A. (2004). "The role of the p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase, and phosphoinositide-3-OH kinase signal transduction pathways in CD40 ligand-induced dendritic cell activation and expansion of virus-specific CD8+ T cell memory responses." *J Immunol* **172**(10): 6047-6056.

Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J., Suresh, M., Altman, J. D., *et al.* (1998). "Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function." *J Exp Med* **188**(12): 2205-2213.

Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H. L. and Hafler, D. A. (1994). "Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis." *J Exp Med* **179**(3): 973-984.

Zhao, M., Zhang, J., Phatnani, H., Scheu, S. and Maniatis, T. (2012). "Stochastic expression of the interferon-beta gene." *PLoS Biol* **10**(1): e1001249.

Zhou, X., Ramachandran, S., Mann, M. and Popkin, D. L. (2012). "Role of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in understanding viral immunology: past, present and future." *Viruses* **4**(11): 2650-2669.

Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. (1974). "Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis." *Nature* **251**(5475): 547-548.

Zucchini, N., Bessou, G., Robbins, S. H., Chasson, L., Raper, A., Crocker, P. R., *et al.* (2008). "Individual plasmacytoid dendritic cells are major contributors to the production of multiple innate cytokines in an organ-specific manner during viral infection." *Int Immunol* **20**(1): 45-56.

7 Anhang

7.1 Original Publikation: „IFN β secreted by microglia mediates clearance of myelin debris in CNS autoimmunity“

Kocur et al. *Acta Neuropathologica Communications* (2015) 3:20
DOI 10.1186/s40478-015-0192-4



RESEARCH

Open Access

IFN β secreted by microglia mediates clearance of myelin debris in CNS autoimmunity

Magdalena Kocur^{1†}, Reiner Schneider^{2†}, Ann-Kathrin Pulm^{1†}, Jens Bauer¹, Sonja Kropp¹, Michael Gliem², Jens Ingwersen², Norbert Goebels², Judith Alferink^{3,4}, Timour Prozorovski², Orhan Aktas^{2†} and Stefanie Scheu^{1*†}

Abstract

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disorder of the central nervous system (CNS) leading to progressive neurological disability. Interferon β (IFN β) represents a standard treatment for relapsing-remitting MS and exogenous administration of IFN β exhibits protective effects in experimentally induced CNS autoimmunity. Also, genetic deletion of IFN β in mice leads to an aggravation of disease symptoms in the MS model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). However, neither the underlying mechanisms mediating the beneficial effects nor the cellular source of IFN β have been fully elucidated.

Results: In this report, a subpopulation of activated microglia was identified as the major producers of IFN β in the CNS at the peak of EAE using an IFN β -fluorescence reporter mouse model. These IFN β expressing microglia specifically localized to active CNS lesions and were associated with myelin debris in demyelinated cerebellar organotypic slice cultures (OSCs). In response to IFN β microglia showed an enhanced capacity to phagocytose myelin *in vitro* and up-regulated the expression of phagocytosis-associated genes. IFN β treatment was further sufficient to stimulate association of microglia with myelin debris in OSCs. Moreover, IFN β -producing microglia mediated an enhanced removal of myelin debris when co-transplanted onto demyelinated OSCs as compared to IFN β non-producing microglia.

Conclusions: These data identify activated microglia as the major producers of protective IFN β at the peak of EAE and as orchestrators of IFN β -induced clearance of myelin debris.

Keywords: IFN β , Microglia, CNS autoimmunity, Multiple sclerosis, EAE

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS). More than 20 years ago, interferon β (IFN β) became the first immunomodulatory substance used in the treatment of MS. IFN β is currently the most commonly used therapy for relapsing-remitting MS (RRMS), reducing relapses and severity of disease [1,2]. Genetic ablation of IFN β or its receptor leads to an increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [3,4] a mouse model exhibiting clinical, neuropathological, and immunological disease manifestations of MS [5]. Conversely, induction of endogenous IFN β by poly (I:C) stimulation suppresses EAE, confirming its protective role in CNS autoimmunity [6]. Today, neither the cellular source of

type I IFN in EAE nor its localization relative to responding cells is known due to a lack of sufficiently sensitive *in situ* tools.

Also, the exact mechanisms underlying the protective effects of IFN β remain incompletely understood. Various IFN β -mediated modes of action have been suggested, including (i) downregulation of matrix metalloproteinase 9 thereby reducing tissue damage and inflammation, (ii) prevention of effector cell migration by downregulating the adhesion molecule very late antigen-4 (VLA-4) [7,8], (iii) downregulation of MHC II molecules on antigen presenting cells combined with upregulation of the inhibitory PD-L1 and PD-L2 ligands [9,10], (iv) inhibition of T cell proliferation [11], (v) the induction of immune cell apoptosis [12] and (vi) most recently the induction of FoxA1⁺ T regulatory cells [13]. Removal of myelin debris has been suggested as an essential protective mechanism ameliorating IFN γ -mediated neuroinflammation by downregulating the transcription levels of pro-inflammatory factors like TNF, IL-1 β , or iNOS [14].

* Correspondence: stefanie.scheu@hhu.de

†Equal contributors

¹Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Medical Faculty, University of Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Kocur et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Reducing inflammation by enhancing phagocytosis efficacy may therefore represent a novel therapeutic approach in the treatment of neuroinflammation as observed in MS. Until now, however, a direct role for IFN β in phagocytosis of myelin or axonal debris has not been shown and the functional consequences of microglial phagocytosis remain largely unexplored.

Though IFN β was shown to delay disease progression, adverse side effects such as depression, flu-like symptoms, skin reactions, and bone marrow suppression have limited its use [15]. Also, IFN β treatment is not always effective, as about 30% to 50% of patients experience breakthrough disease. One reason is production of neutralizing antibodies to IFN β resulting in reduced or complete loss of therapeutic efficacy [16]. Moreover, there is the risk that a long term systemic “block” of inflammation could affect the elicitation of immune responses required for host defense. Therefore, it is of great interest to identify the cellular source and define the mechanisms associated with IFN β -mediated protection against neuroinflammation as a first step in the development of cell-specific treatment regimes.

In this study we characterized the cell type responsible for IFN β production and its impact on microglia effector functions in EAE using a yellow fluorescent protein (YFP) IFN β reporter mouse model, organotypic slice cultures, and adult microglia cell cultures. We demonstrate that microglia are the primary IFN β producing cells during the peak phase of EAE. We further show that IFN β induces localization of microglia in close proximity to myelin debris and subsequently increases microglial phagocytotic activity. These findings and the fact that IFN β -producing microglia orchestrated the clearance of myelin debris in organotypic cerebellar slice cultures reveal a so far unknown function of IFN β . Our data further suggest that future IFN β -based therapies targeting these cells in the CNS can be developed for treatment of demyelinating CNS disorders.

Materials and methods

Mice and EAE induction

Female C57BL/6 N mice were purchased from Charles River. IFN β ^{mob/mob} (messenger of IFN beta: IFN β /YFP reporter mouse) [17], IFN β ^{-/-} [18] and IFNAR1^{-/-} [19] mice were backcrossed for at least 10 generations onto C57BL/6 N background. PLP-EGFP mice were used for indicated organotypic slice culture experiments [20]. All mice were housed under specific pathogen free conditions in the animal research facility of the University of Duesseldorf. Mice at 6–12 weeks of age were used for all experiments. Active EAE was induced by tail-base immunization with 200 μ g of MOG_{35–55} (Biotrend) in complete Freund’s adjuvant (CFA), supplemented with *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (10 mg/ml) (Difco

Laboratories) and 200 ng pertussis toxin (Sigma) on 0d and 2d. A control group was treated with CFA only and 200 ng pertussis toxin on 0d and 2d. Classification of disease progression: 0 no paralysis; 0.5 partial paralysis of tail; 1.0 paralysis of tail; 1.5 unilateral paralysis of hind legs; 2.0 bilateral paralysis of hind legs; 2.5 bilateral paralysis of hind legs with unilateral weakness of forelegs; 3 tetraparesis (abort criteria); 4 death. All animal experiments were approved by the government of North Rhine-Westphalia (Az.: 84–02.04.2013.A466, Az.: 8.87-50.10.34.08.241).

Organ and CNS mononuclear cell isolation

Mice were anesthetized and thereafter perfused with 50 ml ice cold PBS. For qRT PCR and flow cytometric analysis spleen, spinal cord and brain were removed. For flow cytometric analysis spinal cord and brain were homogenized and digested with collagenase/dispase (Roche) followed by DNase I (Roche) digestion. CNS derived mononuclear cells were isolated from the 30%/70% interface of a Percoll gradient after centrifugation at 800 \times g for 25 min at room temperature. For RNA isolation organs were isolated after perfusion with 50 ml PBS and quick-frozen in liquid nitrogen.

Antibodies

We used monoclonal Antibodies against murine CD11b (M1/70), CD86 (GL-1), CD45 (104) from BD Biosciences, CD16/CD32 (2.4G2) from eBioscience for FACS analysis. Antibodies used for the OSC, spinal cord and brain histology: rat-MBP (1:500) from Millipore, rabbit-Iba1 (1:500) from WAKO Chemicals, mouse-Neurofilament (NF-M) (1:1000) from Convance Laboratories Inc., guinea pig-GFAP (1:1000) from SYNaptic Systems, rat-CD68 (1:500) from BioLegend, rat-Mac3 (1:500) from BioLegend, rat-TLR3 (1:500) from BioLegend, rb-pIRF7 (1:400) from Bioss-Antibodies and rabbit-CCR2 (1:500) from Bioss-Antibodies and rtLAMP2 (1:400) von BioLegend. A polyclonal crossreacting anti-GFP antibody was purchased from Abcam. Biotin conjugated donkey-anti-rabbit, as well as normal sera from mouse, rat and donkey were purchased from Jackson Immuno Research. All secondary antibodies conjugated with fluorophores (Cyanine Dye Cy2, Cy3 and Cy5) were purchased from Life Technologies and used in a dilution of 1 to 500.

Flow cytometry and cell sorting

Co-expression of indicated cell surface markers with YFP expression was analyzed on a FACS Canto II (Becton Dickinson). Cells were pre-gated as DAPI. Isolated CNS mononuclear cells or primary adult microglia were sorted on a FACS Aria cell sorter (Becton Dickinson) for CD11b and CD45 and YFP reporter allele expression. RNA isolation of *ex vivo* sorted primary

microglia was performed with the mirVana miRNA isolation kit (Ambion Inc). RNA isolation of *in vitro* sorted primary adult microglia was performed with RNA isolation kit (Fluka).

Intracerebroventricular injection

Mice were anaesthetized with isofluran and placed in a stereotaxic frame. The skull was exposed and trepanated for injection of 6 µg poly (I:C) (Amersham) into the lateral ventricle. The bregma coordinates were AP: -0.3 mm, ML: +1.0 mm, and DV -3.0 mm.

Cell culture

For primary adult microglia culture CNS mononuclear cells were isolated from brain and spinal cord of 4–6 week old mice under sterile conditions and cultured in VLE-DMEM (Biochrom) with 10% FCS, 50 µM β-ME and 15% of M-CSF containing supernatant from L929 cells. The protocol was adapted from Ponomarev [21]. Cells were stimulated on d14 with 50 µg/ml poly (I:C), 6 µg/ml CpG2216 (TIB MOLBIOL), 100 ng/ml Lipopolysaccharide (LPS) from *Salmonella minnesota* R595 (List Biological Laboratories, Inc.), 1 µg/ml Pam3CSK4 (Invivogen) or 100 U/ml mouse recombinant IFNβ (R&D Systems) for 6 h or 24 h as indicated or analysis of phagocytosis capacity was performed with DII-coupled myelin isolated according to Norton and Poduslo [22].

Mouse BV2 cells [23,24] were maintained on uncoated petri plates in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with Glucose (4.5 g/l), 10% FCS (Invitrogen), 20 mM GlutaMAX (Life Technologies) and penicillin/streptomycin (5 µg/ml) (Life Technologies). Media was changed every 2 days and cells were passaged at a confluence of 80-90% performing trypsinization (Invitrogen).

Immunofluorescence of microglial cells

Primary microglia or BV2 cells were once washed with PBS, fixed with 4% PFA for 15 minutes and again washed 2 times with PBS. Cells were blocked for 1 h with 5% (v/v) horse serum (Sigma Aldrich) in 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS. Primary antibodies were diluted in 2.5% (v/v) horse serum, 0.25% (v/v) Triton X-100 in PBS and incubated overnight at 4°C. After three times washing for 5 minutes with 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS the cells were incubated with fluorescent secondary antibodies, diluted in 2.5% (v/v) horse serum, 0.25% (v/v) Triton X-100 in PBS, for 1 h at RT. Cells were counterstained with Hoechst (Life Technology) and mounted on glass slides with Immuno Mount (DABCOTM).

RNA isolation, cDNA synthesis and qRT-PCR

RNA was isolated with RNA isolation Kit (Fluka or Macherey-Nagel). Purified RNA was digested with DNase

I (Roche) to remove trace contaminating genomic DNA. An aliquot corresponding to 0.5 – 3 µg of purified RNA was used for first-strand cDNA synthesis using Superscript III reverse transcriptase and oligo (dT) in a final volume of 20 µl according to the manufacturer's instruction (Invitrogen Life Technologies). cDNA was used for subsequent PCR. Real-time quantification of genes was performed using a SYBR Green RT-PCR assay (Applied Biosystems, USA). Briefly, each 20 µl SYBR green reaction consisted of 5 µl cDNA, 10 µl SYBR Green PCR-mix (2×), 1 µl forward and reverse primer (5pM) and 4 µl distilled water. PCR was performed with the following cycling conditions: 40 cycles of 10 sec at 95°C, 60 sec at 60°C and a separate dissociation step. Specificity of the PCR product was confirmed by examination of the dissociation reaction plots. A distinct single peak indicated only one DNA sequence was amplified during the RT-PCR. The samples were run in duplicates and the level of expression of each gene was compared with the expression of GAPDH. Amplification, detection of specific gene products and quantitative analysis were performed using an "ABI 7500" sequence detection system (Applied Biosystems, USA).

Organotypic slice cultures

Organotypic slice cultures (OSCs) were generated from 10 days old mice as described before [25]. The cerebellum was cut into 400 µm thick slices using a McIlwain tissue chopper (GaLa Instrumente). OSC were dissociated in ice-cold dissecting medium (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Life Technologies) complemented with penicillin/streptomycin (100 U/ml, Life Technologies), 2.5 mg/ml glucose (Sigma Aldrich) and 10 mM kynurenic acid (Sigma Aldrich). OSCs were cultured on Millicell-CM culture plate inserts (Millipore) in culture medium (50% (v/v) MEM, 25% (v/v) HBSS, 25% (v/v) heat-inactivated horse serum, 2 mM glutamine, penicillin/streptomycin (100 U/ml) (all from Life Technologies) and 2.5 mg/ml glucose (Sigma Aldrich) for 3–5 days at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, and then demyelinated with lysolecithin (0.5 mg/ml, 16 h). After incubation the lysolecithin containing medium was removed and replaced with fresh medium. At this point OSCs were used for all experiments. In some experiments OSCs were treated with 100 U/ml mouse rIFNβ as indicated. For the usage of PLP-EGFP slices, fluorescent images were taken on indicated time points with an Olympus BX51 microscope at low magnification and in sterile conditions.

Histology

Brain and spinal cord were fixed with periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) overnight, incubated in 10% sucrose followed by 20% and 30% sucrose incubation steps. Organs were frozen in TissueTek (Sakura). Endogenous peroxidase activity and biotin were blocked. The staining

of YFP was performed with a polyclonal crossreacting anti-GFP antibody overnight with 0.1% Triton at 4°C. Fluorescence was enhanced with TSA Fluorescein (PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions. Sections were mounted with DAPI containing Vectashield [26]. Imaging was performed on an epifluorescence microscope (Eclipse TE 2000, Nikon) with digital camera (CCD-1300, Vosskuehler) and overlaid using Adobe Photoshop.

For immunocytochemistry cryo sections were stained with luxol fast blue (solvent blue from Sigma Aldrich) for demyelination and nuclear fast red (Sigma Aldrich) for nuclei. Imaging was performed on a fluorescent microscope (Olympus BX51) with a digital camera (Olympus F-View II).

OSCs were washed two times in warm PBS, fixed 40 minutes in 4% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized for 1 h with 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma Aldrich) in PBS [25]. OSCs were blocked for 2 h with 5% (v/v) horse serum (Sigma Aldrich) in 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS. Primary antibodies were diluted in 2.5% (v/v) horse serum, 0.25% (v/v) Triton X-100 in PBS and incubated for two days at 4°C. After three times washing for 15 minutes with 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS the OSCs were incubated with fluorescent secondary antibodies, diluted in 2.5% (v/v) horse serum, 0.25% (v/v) Triton X-100 in PBS, overnight at 4°C. OSCs were counterstained with Hoechst (Life Technology) and mounted on glass slides with Immuno Mount (DABCO™). Primary and secondary antibodies used are described above. Imaging was performed on a laser scanning confocal microscope (Zeiss Axiovert 200 M/LSM 510) with a digital camera (Zeiss AxioCam) and a fluorescent microscope (Olympus BX51) with a digital camera (Olympus F-View II). All images were overlaid and processed with Adobe Photoshop. For better visualization of transplanted BV-2 cells on OSCs the cells were circled using Adobe Photoshop software. For quantifying the MBP staining intensity images were analyzed by ImageJ software.

Statistical analysis

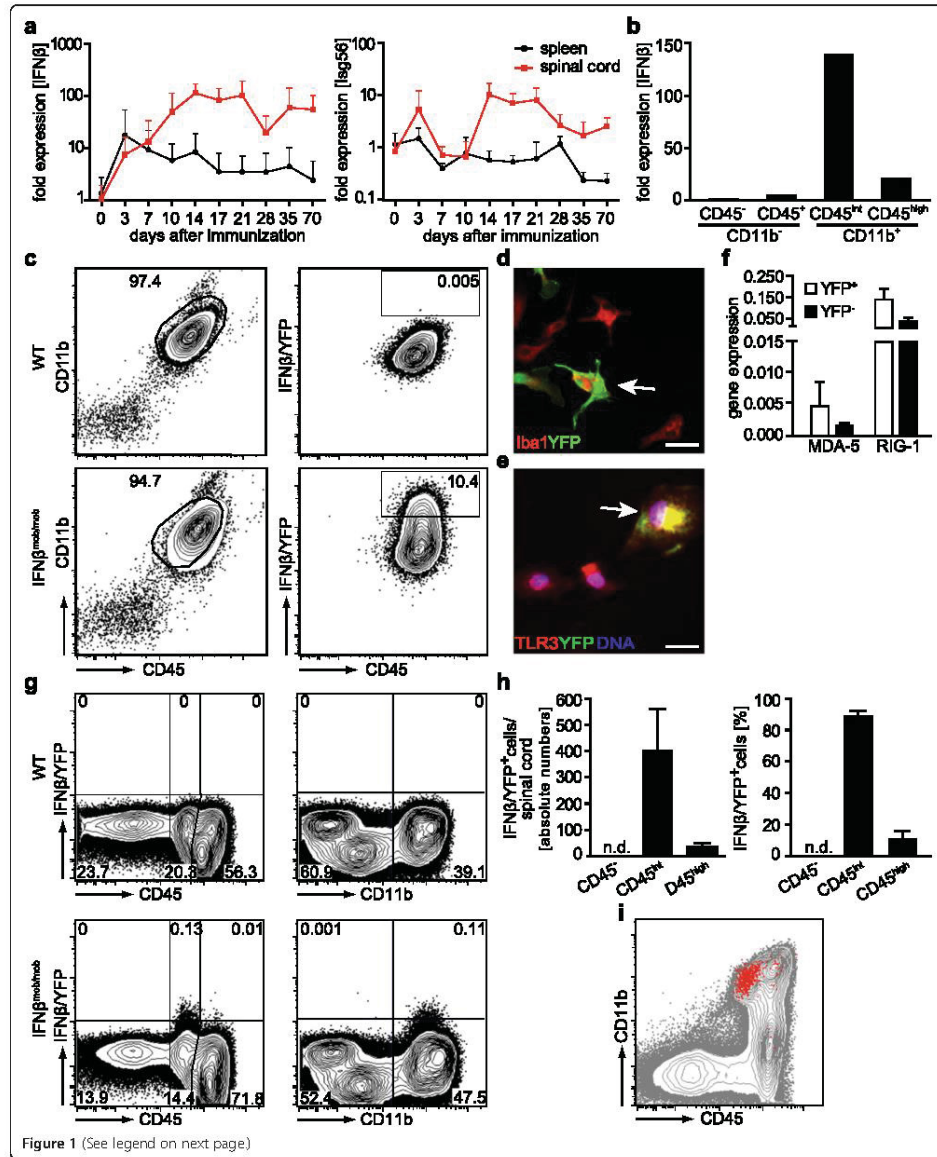
All values in the figures are shown as indicated (mean ± SEM or mean ± SD). Statistical significance was assessed using Student's *t* test (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001).

Results

IFNβ is produced primarily by microglia during the effector phase of EAE

To characterize the expression of IFNβ and a representative IFN-inducible gene (Isg56) in CNS autoimmunity over a long term period we immunized C57BL/6 N mice with MOG_{35–55} peptide (hereafter referred to as MOG) and characterized gene expression for 70 days. In the induction phase when clinical symptoms were still absent

a significant increase in IFNβ mRNA levels was observed in the spinal cord and the spleen. A similar increase in IFNβ message, however, was also detected in adjuvant only controls. In the CNS, IFNβ mRNA levels increased steadily immediately after MOG immunization and reached a plateau in the effector phase of EAE (around day 14) when clinical symptoms were most severe (Figure 1a, Additional file 1: Figure S1a and S1b). However, during remission of clinical symptoms IFNβ expression were maintained at high levels in the CNS. In the spleen, after a transient increase in the induction phase, IFNβ levels remained low throughout the course of disease (Figure 1a, Additional file 1: Figure S1a). Overall Isg56 expression levels paralleled IFNβ expression levels in the CNS. In the spleen, no significant induction of Isg56 expression could be observed indicating that the functional effects of IFNβ were mainly found in the CNS by its direct activation of CNS resident cells or of circulating cells infiltrating the CNS (Figure 1a). To determine the cellular source of IFNβ we sorted mononuclear cells isolated from the spinal cord of MOG-immunized C57BL/6 N mice at the peak phase of EAE according to CD45 and CD11b expression. The vast majority of IFNβ mRNA was found in the CD45^{int} CD11b⁺ cell fraction comprising mainly microglia. Low levels of IFNβ mRNA were also detected in CD45^{high} CD11b⁺ immigrating myeloid cells. In CD45⁺ CD11b⁻ lymphocytes IFNβ expression remained near the detection limit (Figure 1b). A similar expression pattern of IFNβ mRNA was identified in mononuclear cell subsets from the brain of MOG-immunized mice, although at lower mRNA levels (Additional file 1: Figure S1c). To further analyze the intrinsic ability of microglia to produce IFNβ, we cultured primary adult microglia from wildtype (WT) and IFNβ/YFP knock-in reporter (IFNβ^{mob/mob}) mice [17] and stimulated them with the pathogen associated molecular compounds poly (I:C), CpG2216, LPS and Pam3CSK4 (Additional file 2: Figure S2). From these tested stimuli only poly (I:C) induced significant IFNβ expression. Up to 10% of IFNβ^{mob/mob} microglia exhibited IFNβ/YFP expression (Figure 1c, Additional file 2: Figure S2a). Quantitative RT-PCR analyses of FACS-sorted IFNβ-producing primary adult microglia demonstrated only slightly increased MDA-5 and RIG-I mRNA levels when compared to IFNβ non-producers indicating gene expression for intracellular nucleic acid sensing pathways in microglia in general (Figure 1f). Immunofluorescence analysis verified co-expression of the microglial marker Iba1 with TLR3 in IFNβ/YFP⁺ primary microglia cells generated from IFNβ^{mob/mob} mice further demonstrating microglia express pattern recognition receptors for poly (I:C) (Figure 1d and e). We therefore used *in vivo* stimulation with poly (I:C) to initially characterize IFNβ-producing cells in the CNS in response to a strong and local IFNβ inducing stimulus. For



(See figure on previous page.)

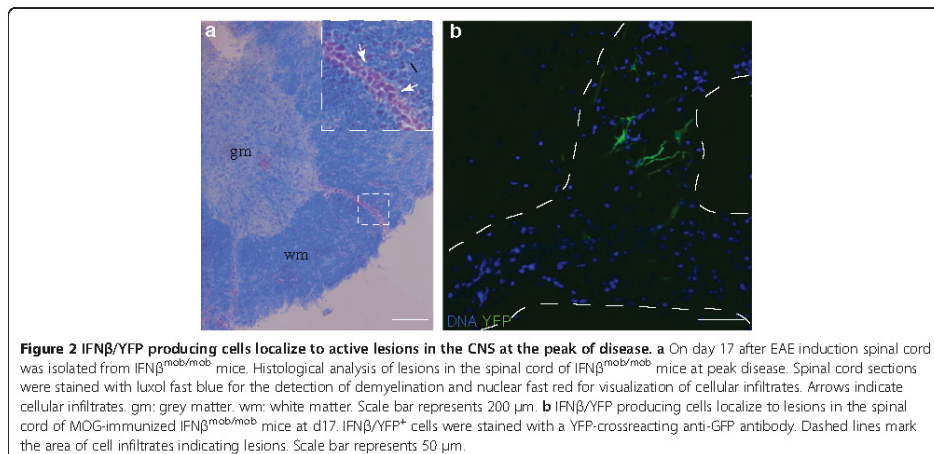
Figure 1 IFN β is predominantly produced by microglia during the effector phase of EAE. a EAE was induced in C57BL/6 N mice by immunization with 200 μ g MOG₃₅₋₅₅ peptide. Pertussis toxin was applied i.p. on d0 and d2. Spleen and spinal cord were isolated at indicated time points after immunization. Relative mRNA expression levels for IFN β (left) and Isg56 (right) were determined by qRT-PCR. Data are pooled from two independent experiments. n = 6–7. **b** On d17 after EAE induction mononuclear cells from the spinal cord of C57BL/6 N mice were sorted for CD45 and CD11b expression. Relative mRNA expression of IFN β was determined by qRT-PCR in the indicated cell populations. **c** Primary adult microglia cultures were generated from WT and IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ mice and stimulated with poly (I:C) for 24 h. IFN β /YFP expression was analyzed by flow cytometry. **d** and **e** Immunofluorescent stainings of primary adult microglia treated as in **(c)**. Cells were stained with anti-Iba1 **(d)** or anti-TLR3 **(e)** and for YFP for fluorescent microscopy. Scale bar represents 50 μ m. **f** Primary adult microglia from IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ mice were stimulated as in **(c)** and sorted for CD45⁺ CD11b⁺ IFN β /YFP⁺ vs. CD45⁺ CD11b⁺ IFN β /YFP⁻ expression. The relative mRNA expression of RIG-I and MDA-5 was determined by qRT-PCR. **g** On d17 after immunization the phenotype of IFN β /YFP expressing cells from the spinal cord of WT and IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ mice was determined for CD45 and CD11b by flow cytometry. **h** Quantification of IFN β /YFP⁺ cells isolated at d17 after immunization from the spinal cord of IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ mice. Shown is one representative experiment out of 3 independent experiments. **i** Representative dot blot shows an overlay of CD45 and CD11b expression of IFN β /YFP⁺ (red) and IFN β /YFP⁻ (grey) cells in the spinal cord of IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ mice on d17 after immunization. Error bars represent SEM.

this, intrathecal stereotactic microinjection of poly (I:C) was performed on IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ mice. Here, CD45^{int} CD11b⁺ cells representing microglia were identified as the main producers of IFN β /YFP in the CNS by flow cytometry (Additional file 3: Figure S3a and S3b). In immunohistology IFN β /YFP expressing cells showed a microglia-like morphology and localized in periventricular CNS regions (Additional file 3: Figure S3c). Next, we determined the identity of IFN β /YFP expressing cells in CNS autoimmunity. No significant differences were observed in the disease course of IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ vs. WT mice (data not shown). Flow cytometric analysis of mononuclear cells isolated from the spinal cord and brain of IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ mice at the peak of disease (17 days after MOG-immunization) showed intermediate CD45 and high CD11b expression on more than 80% of IFN β /YFP⁺ cells (Figure 1g–i, Additional file 4: Figure S4). Thus, the majority of endogenous IFN β producing cells in the CNS during EAE were classified as microglia. Quantitative analysis revealed that IFN β /YFP

expression is restricted to a total of about 400 cells within the spinal cord and less than 50 cells within the brain of MOG-immunized mice (Figure 1h, Additional file 4: Figure S4c). No IFN β /YFP expression was detectable in mononuclear cells from the spinal cord of naive IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ mice (Additional file 4: Figure S4d and S4e). These findings demonstrate that during the EAE effector phase IFN β is expressed in the CNS primarily by a low frequent subpopulation of microglia.

IFN β /YFP producing cells are located within active lesions in the CNS at the peak of disease

To characterize the anatomical localization of IFN β producing cells within the CNS during autoimmunity we performed histological analyses of the spinal cord of IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ mice 17 days after MOG immunization. At this time point, active lesions could be observed within the grey but more prominently within the white matter of the spinal cord (Figure 2a). Nuclear fast red-positive

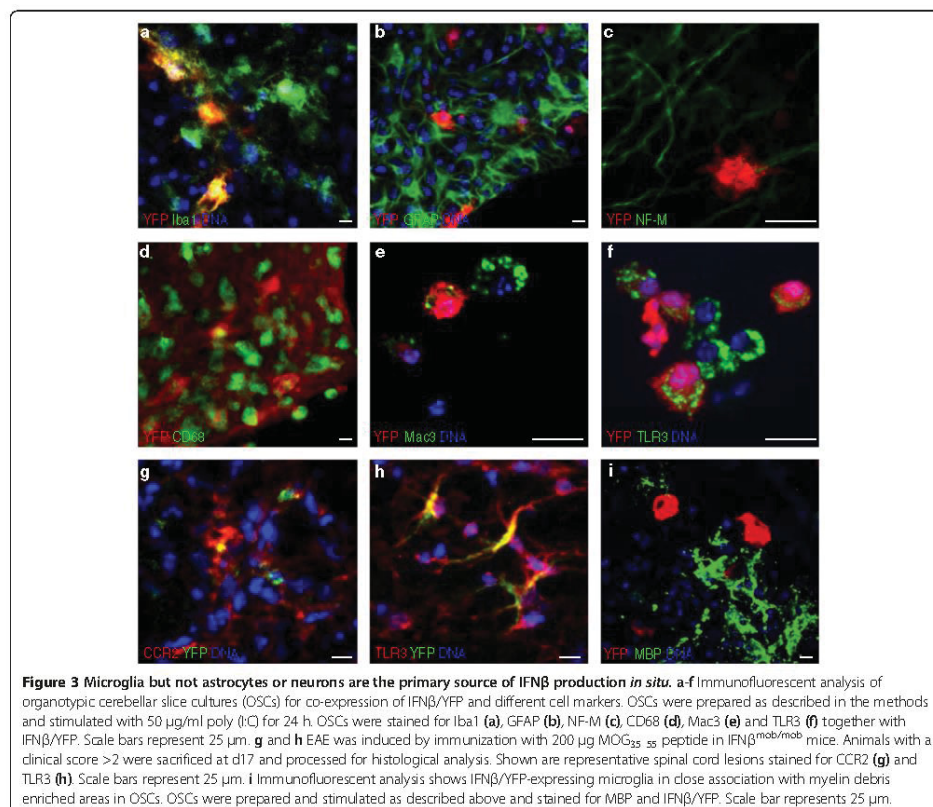


cell infiltrates were identified within demyelinated CNS sites as determined by luxol fast blue staining (Figure 2a). To identify $IFN\beta$ producing cells *in situ* spinal cord sections of $IFN\beta^{mob/mob}$ mice were stained for YFP and analyzed by confocal microscopy. $IFN\beta$ /YFP signals in cellular bodies and their processes were predominantly detected in spinal cord areas containing high numbers of infiltrating cells underscoring that $IFN\beta$ -producing cells accumulate in active lesions of the CNS during EAE (Figure 2b).

Microglia but not astrocytes or neurons are the source of $IFN\beta$ production *in situ*

Next, we determined whether non-hematopoietic CNS cells, not detectable in the flow cytometric analyses, contribute to $IFN\beta$ production during the inflammatory demyelinating response of the CNS. For this, histological analyses of cerebellar organotypic slice cultures (OSCs) harvested from 10 days old $IFN\beta^{mob/mob}$ mice were

performed. OSCs were stimulated with poly (I:C) to induce $IFN\beta$ production and stained for the microglia marker Iba1, the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the neuronal marker neurofilament-medium (NF-M). $IFN\beta$ /YFP immunoreactivity co-localized exclusively with Iba1 but not with GFAP or NF-M indicating that primarily microglia expressed $IFN\beta$ during immune activation *in situ* (Figure 3a-c). $IFN\beta$ /YFP positive cells further co-expressed the phagocytic marker CD68 (Figure 3d) and the microglia activation marker Mac3 (Figure 3e) as well as the pattern recognition receptor TLR3 (Figure 3f). Histological analysis of spinal cord lesions from EAE-induced $IFN\beta^{mob/mob}$ mice at peak of disease revealed that only a small subset of $IFN\beta$ /YFP⁺ cells co-stained positive for CCR2, while the majority of $IFN\beta$ -expressing cells was negative for this macrophage/myeloid marker (Figure 3g). Finally, underscoring their capacity to directly respond to TLR3



ligands most IFN β /YFP expressing cells were found positive for TLR3 (Figure 3h). Using confocal microscopy we found that IFN β /YFP⁺ cells aggregated in close proximity to areas with a high content of myelin debris caused by spontaneous demyelination due to mechanical stress during cerebellar slice preparation (Figure 3i). These results point towards a possible functional role of IFN β /YFP producing cells within demyelinated sites in the CNS.

IFN β enhances microglia association with myelin debris and their phagocytic activity

Phagocytosis by microglia is a cellular process to clear myelin debris in CNS autoimmunity [27]. To investigate whether IFN β affected microglia association with myelin debris and phagocytotic capacity we utilized an *ex vivo* transplantation approach of IFN β treated microglia onto demyelinated OSCs. To this aim microglia were treated with recombinant IFN β (rIFN β), CMTMR labeled and co-transferred together with untreated DiD labeled cells at a 1:1 ratio onto demyelinated OSCs prepared from PLP-EGFP mice [20,28]. Thus, migration of IFN β -stimulated versus untreated control microglia could be monitored on a single viable OSC together with GFP-tagged myelin debris structures. Demyelination occurred broadly on the OSC after the lysophosphatidylcholin (LPC) treatment, without harming the neuronal structures (Additional file 5: Figure S5a). Quantification of microglial cells that localized within myelin debris containing areas 1 h and 4 h after transplantation revealed a significantly increased accumulation of IFN β treated microglia at these sites (Figure 4a). This specific migratory pattern was also observed in BV2 microglia cells upon treatment with IFN β (Additional file 5: Figure S5b and S5c). These data indicate that IFN β promotes the localization of microglia to demyelinated CNS sites.

Next, we examined whether IFN β activates the phagocytic machinery in microglia cells. For this, expression of surface receptors and intracellular proteins involved in phagocytosis and phagosome maturation were assessed in WT, IFN β ^{-/-} or IFNAR1^{-/-} primary microglia as well as the microglia derived, immortalized cell line BV2. Multiple phagocytosis associated genes were markedly upregulated in WT microglia in response to IFN β (Figure 4b, Additional file 5: Figure S5d and S5e), among those, the sensor molecules complement receptor 3 (CR3), signal-regulatory protein alpha (SIRP α) and Fc gamma Receptor 3 (Fc γ R3), shown to be directly involved in myelin phagocytosis in microglia and macrophages [29,30]. In addition, IFN β upregulated microglial expression of molecules functionally involved in the general phagocytic machinery like macrophage scavenger receptor 1 (MSR1), CD68 and milk fat globule-EGF factor 8 (Mfge8) [31,32]. Furthermore, lysosome-associated membrane protein (LAMP) 1 and LAMP2 expression, both important for phagosome assembly were enhanced in response

to IFN β [33]. MBP positive vesicular structures could be observed within IFN β -activated, LAMP2⁺ primary microglia indicating active phagocytosis (Additional file 5: Figure S5f). The fact that most phagocytosis associated genes and Isg56 were also upregulated in IFN β ^{-/-} microglia indicated a limited contribution of endogenously produced IFN β to this gene activation (Figure 4b, Additional file 5: Figure S5d and S5g). We also verified the induction of Isg56 gene expression in WT and IFN β ^{-/-} microglia (Additional file 5: Figure S5g). None of these genes were found to be upregulated in IFNAR1^{-/-} microglia verifying the specific effect of IFN β (Figure 4b).

We further studied whether IFN β affected the capacity of microglia to specifically phagocytose myelin debris. For this microglia cultures from adult WT, IFN β ^{-/-} or IFNAR1^{-/-} mice and BV2 cells were treated with recombinant IFN β (rIFN β) or left untreated and incubated with DiI-fluorescent labeled myelin debris for measurement of phagocytosis efficiency by flow cytometry. WT and IFN β ^{-/-} microglia as well as BV2 microglia phagocytosed myelin debris more efficiently following treatment with IFN β (Figure 4c and d, Additional file 5: Figure S5h and S5i). In contrast, IFNAR1^{-/-} microglia did not exhibit increased phagocytotic rates of myelin debris (Figure 4c and d). These data indicate that IFN β and IFNAR1-mediated signaling is required to stimulate microglial phagocytosis of myelin debris.

To investigate whether IFN β would also induce phagocytosis in the *ex vivo* cerebellar slice culture model we used the PLP-EGFP reporter mouse model to monitor the clearance of myelin debris *in situ* [20]. Thus, we induced demyelination in OSCs from PLP-GFP mice with LPC and treated these cultures with rIFN β (Figure 4e). By using PLP-EGFP OSCs it was possible to measure the myelin content in the same living slice culture before and after the treatment. The myelin debris content was significantly decreased by rIFN β as visualized by reduced EGFP-PLP signal in slices after 24 h treatment as compared to the PBS-treated demyelinated control cultures (Figure 4f and g). To verify the IFN β specific effects in this model we prepared OSCs from WT, IFN β ^{-/-} and IFNAR1^{-/-} mice, induced demyelination with LPC and stimulated them with rIFN β (Figure 4e). The myelin debris pattern was scored using an earlier established method (Additional file 6: Figure S6) [34]. This revealed that WT and IFN β ^{-/-} slice cultures stimulated by rIFN β showed significantly less myelin debris than untreated OSCs (Figure 4h and i). IFNAR1^{-/-} OSCs exhibited no increase in the removal of myelin debris in response to rIFN β , providing additional evidence that IFN β -dependent mechanisms drive myelin debris removal. In a complementary approach we investigated whether endogenously produced IFN β also affects removal of myelin debris in the CNS. Here OSCs from WT and

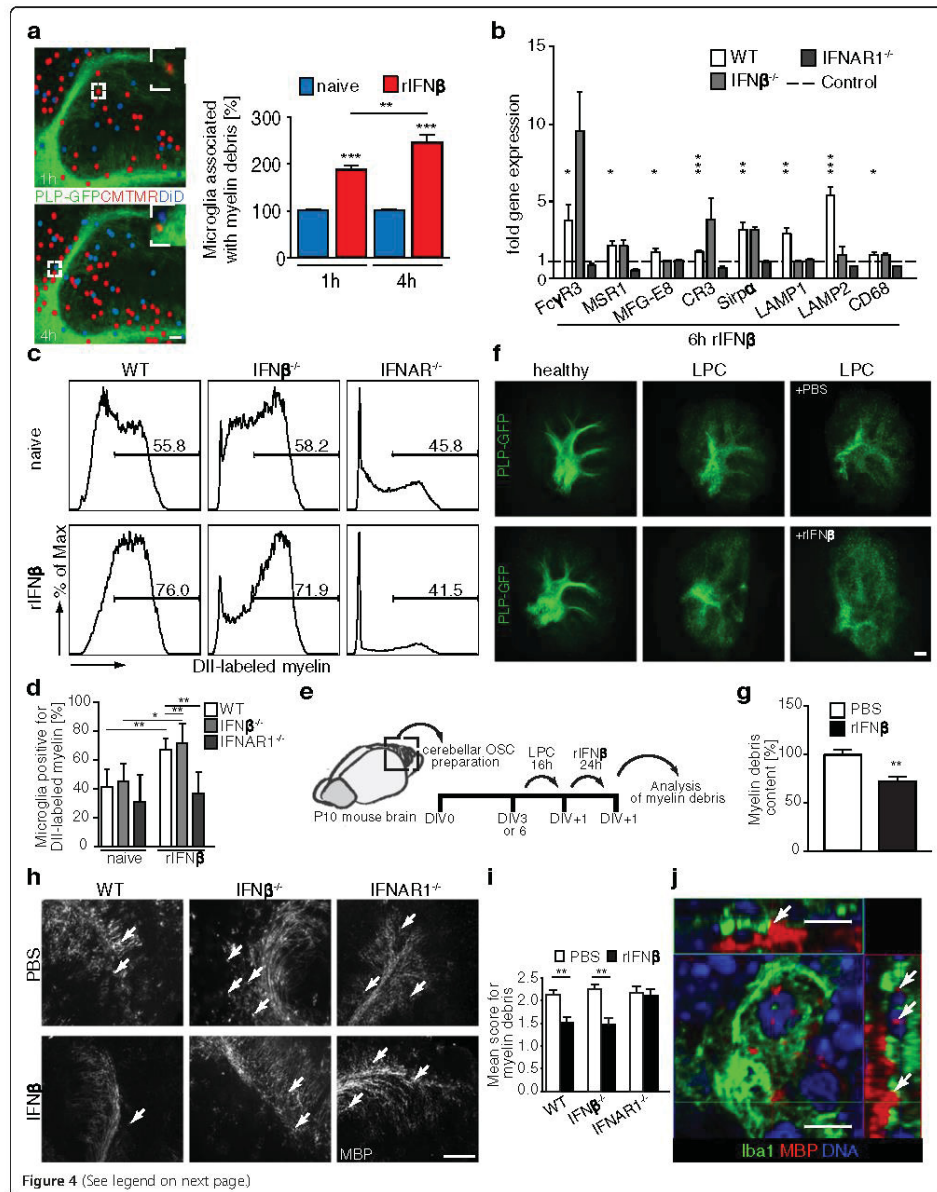


Figure 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 4 IFN β enhances microglia association with myelin debris and phagocytotic activity. **a** Co-cultures of sorted primary adult microglia with demyelinated OSCs. Microglia from C57BL/6 N mice treated with rIFN β and labeled with CMTMR (red) and untreated DiD-labeled (blue) microglia were mixed 1:1 and co-transferred onto LPC-demyelinated OSCs (n = 16) from PLP-EGFP mice. For better visualization transplanted cells were marked using Adobe Photoshop software. Diagrams show percentages of rIFN β -treated (red) and control (blue) microglia associated with myelin debris. **b** Expression of phagocytosis associated genes in WT, IFN $\beta^{-/-}$ and IFNAR1 $^{-/-}$ primary adult microglia after stimulation with rIFN β (6 h). n = 2-4. **c** WT, IFN $\beta^{-/-}$ and IFNAR1 $^{-/-}$ primary adult microglia were left untreated or stimulated with rIFN β (24 h). DiI-labeled myelin was added for the last hour of stimulation. Uptake of myelin was quantified by flow cytometry. **d** Quantification of phagocytosis activity measured in **(c)** (n = 4-7). **e** Experimental setup for analysis of myelin phagocytosis in OSCs **(f,g)**. OSCs were LPC-demyelinated, treated with rIFN β or PBS (24 h), and analysed for myelin debris content. DIV, Days *In Vitro*. **f** OSCs from PLP-EGFP mice treated as in **(e)** were imaged. **g** PLP-EGFP-intensity was analyzed by *ImageJ* software. (n = 16-22). **h** OSCs from WT, IFN $\beta^{-/-}$ and IFNAR1 $^{-/-}$ mice, cultured for 3 days before LPC-demyelination were treated with rIFN β (24 h) or left untreated and stained for MBP. **i** Quantification of myelin debris in OSCs from WT, IFN $\beta^{-/-}$ and IFNAR1 $^{-/-}$ mice after rIFN β treatment. Scoring as described in Additional file 6: Figure S6. (n = 3-4). **j** Confocal Z-stack image from a phagocytic microglia in an WT OSC after poly (I:C) treatment and demyelination. Arrows indicate internalized myelin. Error bars represent SEM **(a,b,g,i)** and SD **(d)**. Scale bars represent 10 μ m **(j)**, 100 μ m **(a,h)**, 1 mm **(f)**.

IFN $\beta^{-/-}$ mice were treated with poly (I:C) and subjected to LPC-induced demyelination. We found a significantly higher intensity of myelin debris in OSCs of IFN $\beta^{-/-}$ compared to WT slices which further underscored that IFN β is functionally involved in the clearance of myelin debris (Additional file 5: Figure S5j and S5k). Myelin debris was detected within the cytoplasm of Iba1 $^{+}$ microglia cells in LPC-treated OSCs by confocal microscopy (Figure 4j). This points to an uptake of myelin debris by microglia induced by IFN β .

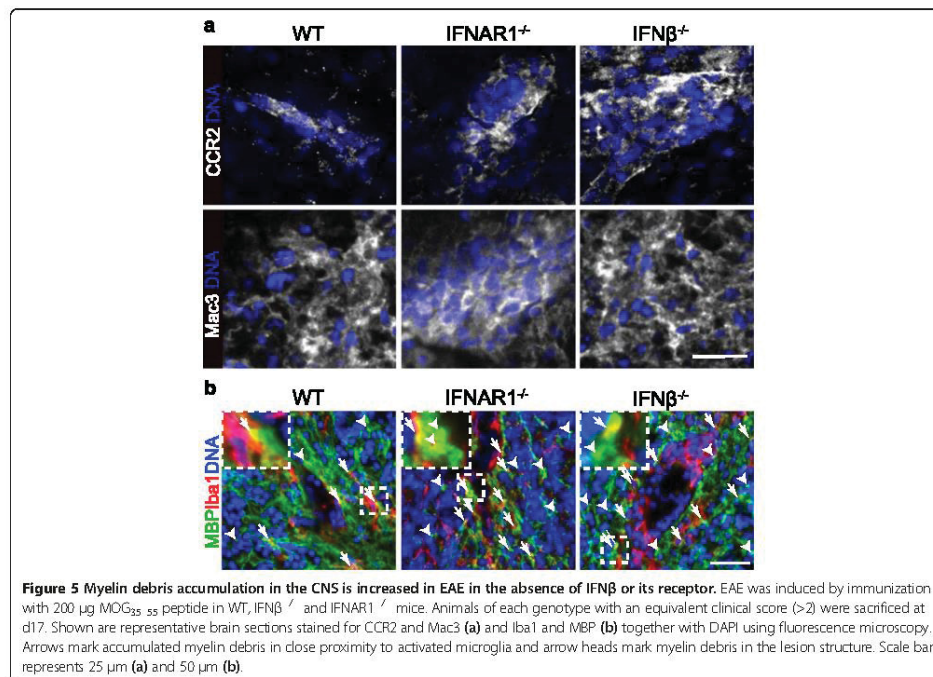
Myelin debris accumulation in the CNS is increased in EAE in the absence of IFN β or its receptor

According to our data, IFN β -producing cells are localized in active lesions of the inflamed CNS and phagocytic potential of primary adult microglia was enhanced after stimulation with rIFN β *in vitro*. To assess the *in vivo* relevance of these findings, we analyzed brain sections and visualized myelin debris accumulation in MOG-EAE induced mice. The majority of lesion infiltrating cells were positive for CCR2 and Mac3 (Figure 5a). To identify the distribution of microglia in active cerebellar lesions and to investigate the myelin debris content we stained brain sections of WT, IFN $\beta^{-/-}$ or IFNAR1 $^{-/-}$ mice for Iba1 and MBP at peak disease (Figure 5b). As assessed by fluorescence microscopy activated microglia characterized by their amoeboid morphology were present in active lesions in close proximity with granular myelin debris. Enhanced amounts of granular myelin debris were found in lesions of IFN $\beta^{-/-}$ and IFNAR1 $^{-/-}$ as compared to WT mice where myelin appears more evenly distributed. These results indicate that a lack of IFN β production or the type I IFN signaling pathway leads to increased myelin debris amounts in active lesions of CNS tissue.

IFN β -producing microglia act as orchestrators of myelin debris removal

Our findings so far indicate that on the one hand microglia produce IFN β in CNS autoimmunity while on the other hand IFN β potently induces removal of myelin

debris in OSCs as well as CNS lesions in the EAE model. Thus, we wanted to clarify whether microglia additional to their phagocytotic capacity are the relevant orchestrators of IFN β mediated effects in myelin debris removal *in vivo*. In primary microglia cell cultures we observed that multiple cells positive for phosphorylated IRF7 localize in close proximity to single IFN β producers in Mac3 $^{+}$ cell accumulations indicating promiscuous activation of IFNAR signalling in neighboring cells (Figure 6a). To investigate whether IFN β -producing microglia harbor the capacity to control clearance of myelin debris in the CNS we transplanted IFN β -producing or non-producing microglia onto cerebellar slice cultures (Figure 6b). To this end primary microglia cells from adult IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ mice were stimulated with poly (I:C) and FACS sorted into IFN β /YFP-producing versus IFN β /YFP non-producing cells. The separated microglia populations were labeled with DiD and transplanted onto LPC-demyelinated OSCs isolated from WT, IFN $\beta^{-/-}$ or IFNAR1 $^{-/-}$ mice. DiD transplanted microglia could be visualized embedded within the population of resident microglia of the OSCs (Figure 6c). To quantify myelin debris surrounding transplanted microglia in demyelinated areas histological staining for MBP was performed. As shown in a representative image of slice co-cultures, IFN β /YFP $^{+}$ microglia integrated in demyelinated regions and associated with affected myelin structures (Figure 6d). Quantitative analysis revealed a significantly decreased intensity of MBP debris in areas proximal to IFN β /YFP $^{+}$ microglia as compared to IFN β /YFP $^{-}$ microglia on WT or IFN $\beta^{-/-}$ slice cultures (Figure 6e). In contrast, no difference in MBP intensity was measurable between areas proximal to IFN β /YFP $^{+}$ vs. IFN β /YFP $^{-}$ microglia transplanted onto IFNAR1 $^{-/-}$ slice cultures. Thus IFN β -expressing microglia can act as inducer cells for clearance of myelin debris. This process is mediated via type I IFN receptor signalling. Taken together, these data demonstrate that IFN β producing microglia exhibit an enhanced capacity to induce phagocytosis of myelin debris highlighting their



functional role as relevant orchestrators for clearance of myelin debris in the CNS.

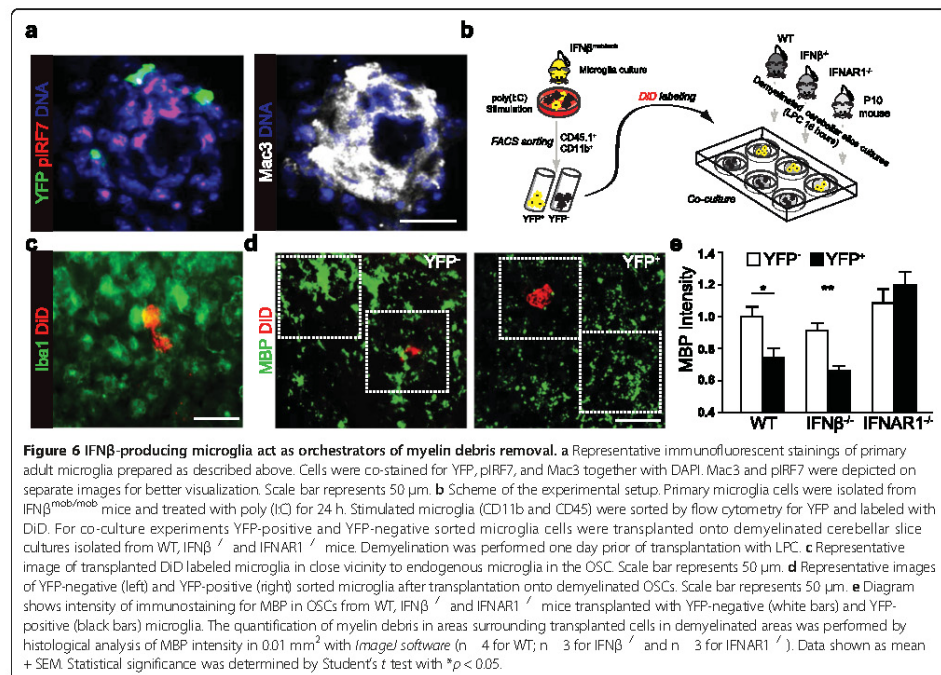
Discussion

The high relevance of IFN β in the therapy of MS and its pleiotropic protective effects in mice and men are irrevocable. Here we identified the so far ill-defined IFN β producing cells in CNS autoimmunity as primarily microglia in active lesions within the CNS. We further demonstrate that these microglia orchestrate phagocytosis of myelin debris in a process mediated by and dependent on IFN β .

Our time course analyses showed that IFN β production and the expression of the IFN-inducible *Isg56* in the CNS starts with the onset of clinical symptoms and increases in parallel with the disease score of MOG-induced EAE. These findings extend previous data showing that IFN β is produced at the peak of EAE exclusively in the CNS [3]. In peripheral lymphoid organs, however, we found IFN β upregulated early after MOG-immunization and decreased afterwards. This initial expression of IFN β is also observed when CEA is administered in the absence of MOG and is therefore the result of the

immuno-adjuvant containing heat-inactivated *M. tuberculosis* that induces a strong innate immune response. Plasmacytoid dendritic cells have been shown to be responsible for this early produced IFN β [35] that exacerbates the clinical course of EAE presumably via contributing to the priming of encephalitogenic T cells. Expression of IFN α/β in the effector phase of disease instead was suggested to mediate protective effects by acting directly on myeloid cells [3].

We identified microglia, but not astrocytes or neurons as the major cellular source of IFN β in the CNS at peak EAE. The identity of IFN β producing cells in the course of EAE has been a long-standing topic of debate. In general, different cell types, mainly professional antigen presenting cells, are capable of producing IFN β in the context of immune activation. Plasmacytoid and classical dendritic cells are capable of IFN β production after TLR9- and TLR3/MDA5-stimulation, respectively [17,36]. During viral infections in the CNS also neurons have been shown to produce IFN β [37]. *In vitro* murine neurons as well as microglia produced IFN β after poly (I:C) stimulation [38,39]. Other brain resident cells reported to produce



predominantly IFN α are astrocytes as shown in Aicardi-Goutières Syndrome, a rare neurodevelopmental disorder [40]. In MS IFN β production was detected in active lesions in cells defined as macrophages and astrocytes based on their morphology [41]. Also, based on morphological studies it was suggested earlier that IFN β may be produced by ramified microglia or infiltrating cells in EAE [4]. Our study defines activated microglia as the prominent IFN β -producing cell type in the CNS as characterized by an intermediate CD45 and high Iba1 expression as well as a hypermorphic-rounded morphology in the IFN β /YFP fluorescence reporter mouse model [42–44]. It has been suggested that an activated CD45 high CD11b $^{+}$ microglia subset with the capacity to differentiate into macrophages or dendritic-like cells plays an active role in the pathogenesis of EAE [21,45]. However, our data indicate that IFN β -expressing microglia did not acquire a CD45 high CD11b $^{+}$ phenotype during MOG-EAE excluding that they phenotypically and functionally resemble the earlier described subset. The fact that in our study IFN β production was identified in microglia not only during EAE but also after intrathecal injection of the molecular pathogen compound poly(I:C) points to a specialized function of these CNS

resident phagocytes to produce type I IFNs. Of note, at early timepoints after intrathecal poly(I:C) application Khorrooshi *et al.* describe a quick mobilization of IFN β producing myeloid cells from the periphery into the CNS (personal communication). The discrepancies between these two studies could be explained by the different modes intrathecal poly(I:C) application was used (intracerebroventricular vs. intracisterna magna), that may cause induction of divergent chemokine patterns driving leukocyte infiltration. However, in this report, also microglia were shown to contribute to IFN β production. The IFN β expression capacity by these cells is in line with our findings on IFN β production by microglia in CNS autoimmunity without prior poly(I:C) stimulation. We could show that IFN β -producing microglia localized in the proximity of myelin lesions and exhibit a superior capacity to induce phagocytosis of myelin debris in surrounding cells. It is yet unclear which chemotactic factors guide positioning of microglia into areas of demyelination in CNS autoimmunity. It has been suggested that astrocytes direct migration and activation of microglia and macrophages in demyelinating lesions via expression of CCL2 and CXCL10. Correspondingly microglia and immigrating

macrophages in MS lesions stained positive for CXCR3 and CCR2 in MS lesions [46]. Recent elegant data defined CCR2 as a selective marker for infiltrating macrophages in the inflamed CNS [47-49]. Our data do not rule out that immigrating myeloid cells contribute to IFN β production as indicated by (i) detection of IFN β mRNA in peripheral tissues early after immunization, (ii) CCR2 expression in a subset of IFN β /YFP $^+$ cells in CNS lesions, and (iii) direct flow cytometric detection of CD45 $^{\text{high}}$ IFN β /YFP $^+$ cells.

The most important finding of our study is that strategically positioned IFN β producing microglia within active CNS lesions exhibit a superior capacity to induce myelin debris removal in surrounding tissue phagocytes. Effective clearance of myelin debris is a critical step in the pathogenesis of MS as well as EAE. While microglia have been attributed important roles in the inflammatory response during infections and CNS autoimmunity [50] it is still a matter of debate whether microglia represent efficient phagocytes in the CNS [27]. Here we could show that phagocytosis of myelin debris by microglia was dependent on IFN β and its receptor IFNAR1. These findings are supported by recent studies showing that *in vitro* microglia deficient in TIR domain containing adapter inducing interferon beta (TRIF) $^{-/-}$ less effectively cleared axonal debris. These microglia further exhibited an increased threshold for activation of interferon-regulated genes, suggesting that IFN β may upregulate phagocytic activity [51]. In contrast to this, earlier studies suggested that IFN β suppresses the phagocytosis of myelin debris *in vitro* [3]. In these studies, phagocytic activity, however, was tested in peritoneal macrophages or CD11b $^+$ cells in the CNS not differentiating between resident microglia and immigrated macrophages from the periphery. The discrepancy to our data can therefore be explained by differences in the phagocytic activity of microglia and macrophages [52].

The EAE *in vivo* model exhibits a high variability in disease severity and in the localization of CNS lesions between individual animals. Also the suppressive effect of IFN β and IFNAR mediated signalling on EAE development might reduce demyelination as well as microglia activation [3,4], and Khorooshi et al., personal communication. To eliminate this variability, the unwanted bias and the influence of peripheral immune responses, we used the model of LPC-induced demyelination on OSCs [28] allowing a reproducible and controlled evaluation of IFN β and microglia mediated effects. IFN β expressing microglia specifically localized to demyelinated regions in OSCs and further showed lower amounts of myelin debris in their direct proximity in comparison to IFN β non-producers indicative of a more efficient myelin debris removal. This phagocytosis activating effect was confirmed by transfer of IFN β /YFP producing microglia on

demyelinated WT as well as IFN $\beta^{-/-}$ OSCs but was not observed on IFNAR1 deficient OSCs. These data point towards a pivotal function of IFN β producing microglia in the orchestration of phagocytosis of myelin debris by not only neighboring microglia but also immigrating phagocytes in CNS autoimmunity. It remains to be shown, however, whether the effects observed in EAE can be translated into human MS. While myelin phagocytosis has been suggested to contribute to damage processes in MS by the associated oxidative burst, a number of studies have shown beneficial effects for the effective clearing of myelin debris [27]. Phagocytosis of myelin debris by activated microglia was observed in MS lesions [53] and was essential to promote regeneration [54]. Recently, overexpression of the phagocytosis triggering receptor TREM2 was shown to reduce the severity of clinical symptoms in EAE [55]. Myelin debris was shown to impair remyelination by inhibiting differentiation as well as the recruitment of oligodendrocyte precursor cells after injury [56]. Also, myelin directly inhibited axonal re-growth as it contains several growth inhibitory molecules such as Nogo A [57]. A secondary protective effect of IFN β -activated myelin phagocytosis might be the induction of a regulatory type of microglia resembling M2 macrophages [58].

Conclusions

A number of studies indicate that myelin clearance in the CNS after demyelination is protective or ameliorates disease symptoms in EAE and MS. Here, we identify microglia as orchestrators of myelin phagocytosis via production of the protective IFN β at the peak of CNS autoimmunity. Our findings represent novel insights into the *in vivo* functions of microglia-derived IFN β and the feasibility of novel therapeutic approaches for MS specifically targeting CNS microglia.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Clinical score of C57BL/6 N mice after MOG immunization and IFN β expression in the CNS. a EAE was induced in C57BL/6 N mice by immunization with MOG₃₅₋₅₅ (200 μ g). Pertussis toxin was applied i.p. on d0 and d2. Data represent 6 – 15 animals for each time point. Error bars represent SEM. b C57BL/6 N mice were treated with CFA only. Pertussis toxin was applied i.p. on d0 and d2. The spleen and the spinal cord were isolated at indicated time points after CFA immunization. Relative mRNA expression levels of IFN β were determined by qRT-PCR. Error bars represent SD. n = 3–4. c IFN β expression on d17 after MOG-immunization. Shown is IFN β mRNA expression of sorted cell populations isolated from the brain of C57BL/6 N mice according to their CD45 and CD11b expression. The relative mRNA expression of IFN β was determined by qRT-PCR.

Additional file 2: Figure S2. Induction of IFN β production in primary adult microglia by molecular pathogen compounds. a and b Primary adult microglia cultures were generated from WT and IFN $\beta^{\text{mb/mob}}$ mice. On d14 microglial cells were stimulated with 50 μ g/ml poly (I:C), 6 μ g/ml

CpG2216, 100 ng/ml LPS or 1 µg/ml Pam3CSK4 for 24 h. IFNβ/YFP (a) and CD86 (b) expression was analyzed by flow cytometry.

Additional file 3: Figure S3. IFNβ expression in the CNS after intrathecal poly (I:C) stimulation. WT and IFNβ^{mob/mob} mice were injected intrathecally with 6 µg poly (I:C). a IFNβ/YFP expression in the brain-isolated mononuclear cells was determined by flow cytometry 24 h after stimulation. DAPI⁺ cells were gated for CD45, CD11b and IFNβ/YFP expression. b Representative dot blot shows an overlay of CD45 and CD11b expression of IFNβ/YFP⁺ (red) and IFNβ/YFP⁻ (grey) cells isolated from the brain of IFNβ^{mob/mob} mice on d17 after immunization. c Localization of IFNβ/YFP expressing cells was determined by immunofluorescence of brain slices of IFNβ^{mob/mob} mice. IFNβ/YFP was stained with a YFP-crossreacting anti-GFP antibody. Nuclei were stained with DAPI (grey) (10-fold magnification).

Additional file 4: Figure S4. Microglia express IFNβ/YFP in MOG-EAE in the brain. a EAE was induced in WT and IFNβ^{mob/mob} mice with 200 µg MOG₃₅₋₅₅ peptide. On d17 after immunization the phenotype of IFNβ/YFP expressing cells from the brain was determined in DAPI⁺ cells stained for CD45 and CD11b by flow cytometry. b Representative dot blot shows an overlay of CD45 and CD11b expression of IFNβ/YFP⁺ (red) and IFNβ/YFP⁻ (grey) cells isolated from the brain of IFNβ^{mob/mob} mice on d17 after immunization. c Quantification of IFNβ/YFP⁺ cells in the brain of IFNβ^{mob/mob} mice on d17 after immunization. Error bars represent SEM. d Mononuclear cells from the spinal cord of naive WT and IFNβ^{mob/mob} mice were analyzed by flow cytometry as shown in a. e Representative dot blot of an overlay of CD45 and CD11b expression shows no IFNβ/YFP expressing cells under naive conditions.

Additional file 5: Figure S5. Impact of IFNβ on myelin phagocytosis. a Histological analysis of LPC-demyelinated or untreated OSCs stained with anti-NF-M and anti-MBP antibodies. b Untreated microglia were labeled with DiI (blue circles) and mixed (ratio 1:1) with CFSE labeled cells treated with rIFNβ for 24 h (red circles) before transfer onto LPC-demyelinated OSCs. For better visualization transplanted BV2 cells were marked using Adobe Photoshop software. c Quantification of myelin associated BV2 cells from (b). Diagram shows percentages of IFNβ-treated (red bars) and control (blue bars) BV2 cells associated with myelin debris. (n = 4). d qRT-PCR for genes involved in the phagocytic process in WT, IFNβ^{-/-} and IFNAR1^{-/-} primary adult microglia stimulated with rIFNβ (24 h). (n = 2-4). e Expression of genes involved in the phagocytic process in BV2 microglia upon IFNβ treatment. Cells were stimulated as in (d). (n = 3). f Immunofluorescent staining of primary adult microglia after incubation with DiI-labeled myelin for 2 h. Cells were stained with anti-Iba1, anti-LAMP2 and anti-MBP antibodies for fluorescent microscopy. g qRT-PCR analysis of Isg56-gene expression in WT, IFNβ^{-/-} and IFNAR1^{-/-} primary microglia treated with rIFNβ (6 h, 24 h). h and i Uptake of DiI-labeled myelin by BV2 cells in response to rIFNβ. BV2 cells were 24 h pre-treated with rIFNβ and incubated with DiI-labeled myelin for 1 h. h Quantification of BV2 cells co-localized with DiI-myelin. (n = 6). i BV2 cells were stained for Iba1 and Hoechst. j and k Quantitative analysis of myelin debris in demyelinated OSCs of IFNβ^{+/+} and IFNβ^{-/-} mice. Demyelination was induced as in (a) and production of IFNβ induced with poly (I:C). On d6 MBP intensity was analyzed using *ImageJ* software. (n = 3). Error bars represent SEM. Scale bars represent 50 µm (f), 100 µm (a,b), 1 mm (j).

Additional file 6: Figure S6. Scoring table for myelin debris quantification. OSCs were prepared as described and demyelinated by LPC treatment. OSCs were further processed for MBP-staining. The scoring scheme represents the amount of myelin debris in 0.1 mm² in OSCs stained for MBP. A score of "0" points to no visible myelin debris and score "3" displays an area covered with myelin debris (indicated by arrows). Scale bar represents 100 µm.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MK, RS, AP, JA, TP, OA, SS conceived and designed the experiments; MK, RS, AP, SK, JB, JA, MG, JI performed the experiments; MK, RS, AP analyzed data; TP, OA, SS supervised the work; MK, RS, AP, JA, SS wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Magdalena Kocur, Reiner Schneider and Ann-Kathrin Pulm are co-first authors. Orhan Aktas and Stefanie Scheu are co-senior authors.

Acknowledgments

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sche692/3-1, Sche692/4-1, EXC 1003-GIM) and the Strategic Research Fund of the Heinrich-Heine-University Duesseldorf. For some illustrations the sevier medical art database was used.

Author details

¹Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Medical Faculty, University of Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany. ²Department of Neurology, Medical Faculty, University of Duesseldorf, Duesseldorf, Germany. ³Department of Psychiatry, University of Muenster, Muenster, Germany. ⁴Cluster of Excellence EXC 1003, Cells in Motion, Muenster, Germany.

Received: 30 January 2015 Accepted: 3 February 2015

Published online: 03 April 2015

References

- Aktas O, Kieseier B, Hartung HP (2010) Neuroprotection, regeneration and immunomodulation: broadening the therapeutic repertoire in multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 33:140–152. doi:10.1016/j.tins.2009.12.002
- Paty DW, Li DK (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 43:662–667
- Prinz M, Schmidt H, Mildner A, Knobloch KP, Hanisch UK, Raasch J, Merkler D, Detje C, Gutcher I, Mages J, Lang R, Martin R, Gold R, Becher B, Bruck W, Kalinke U (2008) Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 28:675–686. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.011
- Teige I, Treschow A, Teige A, Mattsson R, Navikas V, Leanderson T, Holmdahl R, Issazadeh-Navikas S (2003) IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 170:4776–4784
- Hohlfeld R, Wekerle H (2001) Immunological update on multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 14:299–304
- Touil T, Fitzgerald D, Zhang GX, Rostami A, Gran B (2006) Cutting Edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN-beta. *J Immunol* 177:7505–7509
- Calabresi PA, Pelfrey CM, Tranquilli LR, Maloni H, McFarland HF (1997) VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Neurology* 49:1111–1116
- Nelissen I, Ronse I, Van Damme J, Opendakker G (2002) Regulation of gelatinase B in human monocyte and endothelial cells by PECAM-1 ligation and its modulation by interferon-beta. *J Leukoc Biol* 71:89–98
- Wiesemann E, Deb M, Trebst C, Hemmer B, Stangel M, Windhagen A (2008) Effects of interferon-beta on co-signaling molecules: upregulation of CD40, CD86 and PD-L2 on monocytes in relation to clinical response to interferon-beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 14:166–176. doi:10.1177/1352458507081342
- Teige I, Liu Y, Issazadeh-Navikas S (2006) IFN-beta inhibits T cell activation capacity of central nervous system APCs. *J Immunol* 177:3542–3553
- Pette M, Pette DF, Muraro PA, Farnon E, Martin R, McFarland HF (1997) Interferon-beta interferes with the proliferation but not with the cytokine secretion of myelin basic protein-specific, T-helper type 1 lymphocytes. *Neurology* 49:385–392
- Gniadek P, Aktas O, Wandinger KP, Bellmann-Strobl J, Wengert O, Weber A, von Wussow P, Obert HJ, Zipp F (2003) Systemic IFN-beta treatment induces apoptosis of peripheral immune cells in MS patients. *J Neuroimmunol* 137:187–196
- Liu Y, Carlsson R, Cornabella M, Wang J, Kosicki M, Carrion B, Hasan M, Wu X, Montalban X, Dzielcielj MH, Sellebjerg F, Sorensen PS, Helin K, Issazadeh-Navikas S (2014) FoxA1 directs the lineage and immunosuppressive properties of a novel regulatory T cell population in EAE and MS. *Nat Med* 20:272–282. doi:10.1038/nm.3485
- Liu Y, Hao W, Letiembre M, Walter S, Kulanga M, Neumann H, Fassbender K (2006) Suppression of microglial inflammatory activity by myelin

- phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J Neurosci* 26:12904–12913, doi:10.1523/JNEUROSCI.2531-06.2006
15. Munschauer FE 3rd, Kinkel RP (1997) Managing side effects of interferon-beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Ther* 19:883–893
 16. Perini F, Calabrese M, Biasi G, Gallo P (2004) The clinical impact of interferon beta antibodies in relapsing-remitting MS. *J Neurol* 251:305–309, doi:10.1007/s00415-004-0312-8
 17. Scheu S, Dresing P, Locksley RM (2008) Visualization of IFN β production by plasmacytoid versus conventional dendritic cells under specific stimulation conditions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20416–20421, doi:10.1073/pnas.0808537105
 18. Erlanson L, Blumenthal R, Ekoranta ML, Engel H, Alm G, Weiss S, Leanderson T (1998) Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curr Biol* 8:223–226
 19. Hwang SY, Fierzig PJ, Holland KA, Surnarsono SH, Tymms MJ, Hamilton JA, Whitty G, Bertonecchio L, Kola J (1995) A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11284–11288
 20. Sobottka B, Ziegler U, Raech A, Becher B, Goebel H (2011) CNS live imaging reveals a new mechanism of myelination: the liquid coissant model. *Glia* 59:1841–1849, doi:10.1002/glia.21238
 21. Pomornarev ED, Shriver LP, Manes K, Dittel BN (2005) Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res* 81:374–389, doi:10.1002/jnr.20488
 22. Norton WT, Podusko SE (1973) Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem* 21:749–757
 23. Biasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-src/myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27:229–237
 24. Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Biasi E, Sick P, Kettenmann H (1992) An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J Neurosci Res* 31:616–621, doi:10.1002/jnr.490310405
 25. Altas O, Smorodchenko A, Brodke S, Infante-Duarte C, Schulze Topphoff U, Vogt J, Proszynski T, Meier S, Osmanova V, Pohl E, Bechmann J, Nitsch R, Zipp F (2005) Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL. *Neuron* 46:421–432, doi:10.1016/j.neuron.2005.03.018
 26. Dresing P, Borkens S, Kocur M, Kropp S, Scheu S (2010) A fluorescence reporter model defines "Tip-DCs" as the cellular source of interferon beta in murine hepatitis. *PLoS One* 5:e15567, doi:10.1371/journal.pone.0015567
 27. Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H (2012) Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci* 7:6, doi:10.3389/fncel.2013.00006
 28. Birgbauer E, Pao TS, Webb M (2004) Lysolecithin induces demyelination in vitro in a cerebellar slice culture system. *J Neurosci Res* 78:157–166, doi:10.1002/jnr.20248
 29. Gitik M, Liraz-Zaltsman S, Oldenberg PA, Reichert F, Rotshenker S (2011) Myelin down-regulates myelin phagocytosis by microglia and macrophages through interactions between CD47 on myelin and SIRPalpha (signal regulatory protein-alpha) on phagocytes. *J Neuroinflammation* 8:24, doi:10.1186/1742-2094-8-24
 30. Makranz C, Cohen G, Baron A, Levidor L, Kodama T, Reichert F, Rotshenker S (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase, phosphoinositide-specific phospholipase C-gamma and protein kinase C: signal myelin phagocytosis mediated by complement receptor-3 alone and combined with scavenger receptor-IIIb in macrophages. *Neurobiol Dis* 15:279–286, doi:10.1016/j.nbd.2003.11.007
 31. Liu Y, Yang X, Guo C, Nie P, Liu Y, Ma J (2013) Essential role of MFG-E8 for phagocytic properties of microglial cells. *PLoS One* 8:e55754, doi:10.1371/journal.pone.0055754
 32. Thomas CA, Li Y, Kodama T, Suzuki H, Silverstein SC, El Khoury J (2000) Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J Exp Med* 191:147–156
 33. Hlynnh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malesvanets A, Saffig P, Grinstein S (2007) LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J* 26:313–324, doi:10.1038/sj.emboj.7601511
 34. Shkupuletz T, Hackstette D, Bauer K, Gudi V, Pul R, Voss E, Berger K, Kipp M, Baumgartner W, Stangel M (2013) Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. *Brain* 136:147–167, doi:10.1093/brain/aww262
 35. Isaksson M, Ardesjo B, Ronnbom L, Kampe C, Lassmann H, Ekoranta ML, Lobell A (2009) Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur J Immunol* 39:2925–2935, doi:10.1002/eji.2008039179
 36. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, C'Gara A, Bron C, Biele F, Trinchieri G (2001) Mouse type 1 IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2:1144–1150, doi:10.1038/ni1736
 37. Delhaye S, Paul S, Bakgori G, Minet M, Weber F, Staeheli P, Michiels T (2006) Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7835–7840, doi:10.1073/pnas.0602460103
 38. Town T, Jeng D, Alexopoulou L, Tan J, Flavell RA (2006) Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3. *J Immunol* 176:3804–3812
 39. Wang LA, Massa FT (1995) Neuron-specific regulation of major histocompatibility complex class I, interferon-beta, and antiviral state genes. *J Neuroimmunol* 58:145–155
 40. van Heteren JT, Rozenberg F, Aronica E, Troost D, Lebon P, Klijsters TW (2008) Astrocytes produce interferon-alpha and CXCL10, but not IL-6 or CXCL8, in Alcaidi-Goutieres syndrome. *Glia* 56:568–578, doi:10.1002/glia.20639
 41. Traugott U, Lebon P (1988) Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann Neurol* 24:243–251, doi:10.1002/ana.410240211
 42. Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S (1998) A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocyte lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224:855–862, doi:10.1006/bbrc.1996.1112
 43. Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dornes R, Butcher GW, ter Meulen V (1991) Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7438–7442
 44. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314–1318, doi:10.1126/science.1110647
 45. Murphy AC, Lalo S, Lynch MA, Mills KH (2010) Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 24:541–551, doi:10.1016/j.bbi.2010.01.014
 46. Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A, Matsumoto Y (2006) Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 112:195–204, doi:10.1007/s00401-006-0083-7
 47. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Galic B, Wu PM, Doytan CE, Lin J, Costeur AC, Kidd G, Zorko MM, Sun N, Hu W, Liu L, Lee JC, Taylor SE, Uehlein L, Dixon D, Gu J, Fioruta CA, Zhu M, Charo IF, Weiser HU, Ransohoff RM (2014) Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* 211:1533–1549, doi:10.1084/jem.20132477
 48. Mizutani M, Pino PA, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Cardona AE (2012) The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *J Immunol* 188:29–36, doi:10.4049/jimmunol.1100421
 49. Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Costeur AC, Tsoo CL, Ransohoff RM, Charo IF (2010) Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One* 5:e13693, doi:10.1371/journal.pone.0013693
 50. Najak D, Roth TL, McGavern DB (2014) Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 32:367–402, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120240
 51. Hosmane S, Tegenge MA, Rajbhandari L, Uppinnying P, Kumar NG, Thakur N, Venkatesan A (2012) Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter inducing interferon-beta mediates microglial phagocytosis of degenerating axons. *J Neurosci* 32:7745–7757, doi:10.1523/JNEUROSCI.0203-12.2012
 52. Kuhmann T, Wendling U, Nolte C, Zipp F, Maruschak B, Stadelmann C, Siebert H, Bruck W (2002) Differential regulation of myelin phagocytosis by macrophages/microglia: involvement of target myelin, Fc receptors and activation by intravenous immunoglobulins. *J Neurosci Res* 67:185–190
 53. Bauer J, Smitina T, Wouterlood FG, Dijkstra CD (1994) Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic

- relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 38:365–375, doi:10.1002/jnr.490380402
54. Napoli I, Neumann H (2010) Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol* 225:24–28, doi:10.1016/j.expneurol.2009.04.024
55. Takahashi K, Prinz M, Stagi M, Chechneva O, Neumann H (2007) TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS Med* 4:e124, doi:10.1371/journal.pmed.0040124
56. Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ (2006) Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci* 26:328–332, doi:10.1523/JNEUROSCI.2615-05.2006
57. David S, Lacroix S (2003) Molecular approaches to spinal cord repair. *Annu Rev Neurosci* 26:411–440, doi:10.1146/annurev.neuro.26.043002.094946
58. Goldmann T, Prinz M (2013) Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clin Dev Immunol* 2013:208093, doi:10.1155/2013/208093

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierung der DC Subpopulationen; modifiziert nach Poltorak und Schraml 2015.	4
Abbildung 2: Entwicklung von Mikroglia während der Embryogenese und Makrophagen postnatal aus dem Knochenmark; modifiziert nach Prinz und Priller 2014.....	7
Abbildung 3: Induktion von IFNβ und IL-12 und der Signalweg von IFNβ über den Typ I IFN Rezeptor (IFNAR).....	12
Abbildung 4: Weltweite Prävalenz der Multiplen Sklerose pro 100.000 Einwohner; modifiziert nach Hedstrom <i>et al.</i> 2011.....	16
Abbildung 5: Proteine der Myelinscheide.	20
Abbildung 6: Schematische Darstellung des IFNβ^{mob/mob} Reportermausmodell.....	34
Abbildung 7: Schematische Darstellung des IFNβ^{mob/mob} x IL-12^{get40/get40} Doppel-Reporter-mausmodell.	35
Abbildung 8: Analyse der Serumwerte von IL-12p40 und IFNβ.	52
Abbildung 9: Anatomische Einteilung der Milzareale zur histologischen Auswertung.	54
Abbildung 10: Histologische Lokalisation der IL-12p40 und IFNβ Produzenten in Gewebeschnitten der Milz nach LCMV Infektion.	55
Abbildung 11: Histologische Lokalisation der IL-12p40 und IFNβ Produzenten in Gewebeschnitten der Milz nach TLR Stimulation.....	56
Abbildung 12: Absolute Zahl der Zytokinproduzenten innerhalb der verschiedenen Milzareale.	58
Abbildung 13: Analyse der IL-12p40 und IFNβ Expression auf Einzelzellebene.....	60

Abbildung 14: Phänotypische Charakterisierung der IL-12p40- und IFN β -produzierenden Zellen auf Einzelzellebene.....	63
Abbildung 15: Analyse der Anzahl dendritischer Zellen in der Milz und Untersuchung der Apoptoserate dieser Zellen nach Infektion.....	64
Abbildung 16: Analyse der Kapazität von Mikroglia IFN β zu produzieren.	70
Abbildung 17: Lokalisation IFN β /YFP produzierender Zellen innerhalb aktiver Läsionen am Höhepunkt der EAE.	72
Abbildung 18: Analyse der zellulären IFN β Quelle in <i>in situ</i> stimulierten Organotypischen zerebellären Schnittkulturen.	74
Abbildung 19: Lokalisation IFN β stimulierter Mikroglia innerhalb LPC-demyelinisierter OSCs.....	76
Abbildung 20: Der Einfluss von exogenem IFN β auf die Phagozytose von Myelin Debris.	78
Abbildung 21: Der Einfluss von endogenem IFN β auf die Phagozytose von Myelin Debris.	80
Abbildung 22: Myelin Phagozytose durch Mikroglia.	81
Abbildung 23: Charakterisierung der Mikroglia und ihrer Lokalisation zu Myelinstrukturen in ZNS Läsionen.	82
Abbildung 24: Untersuchung des Abbaus von Myelin Debris durch <i>in vitro</i> generierte primäre Mikroglia transplantiert auf organotypische zerebelläre Schnittkulturen.	84

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Subtypen muriner dendritischer Zellen; modifiziert nach Gi <i>et al.</i> 2009.	3
Tabelle 2: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.	29
Tabelle 3: Klassifizierung des Krankheitsverlaufs der EAE.	37

7.4 Abkürzungsverzeichnis

-	Negativ
%	Prozent
+	Positiv
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BHS	Bluthirnschranke
CD	engl. cluster of differentiation
cDC	Konventionelle dendritische Zelle (engl. conventional dendritic cell)
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFA	komplettes Freund-Adjuvans (engl. complete Freund's adjuvant)
CpG ODN	CpG enthaltende Oligonukleotide
CTL	zytotoxische T Lymphozyt (engl. Cytotoxic T lymphocyte)
d	Tag
dH ₂ O	Destilliertes Wasser (Millipore)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N trimethylammoniummethylsulfate
ds	doppelsträngig (engl. double-stranded)
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent Assay
<i>et. al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
<i>etc.</i>	<i>et cetera</i> , und so weiter/und die übrigen
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (engl. fluorescent activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Gauge

GFAP	Saures Gliafaserprotein
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. green fluorescent protein)
GM-CSF	engl. granulocyte macrophage colony stimulating factor
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IFNAR	Typ I Interferon Rezeptor
IL	Interleukin
int	intermediär
IRF	Interferon-regulierender Faktor
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISGF	Interferon-stimulierter Genfaktor
ISRE	Interferon-sensitives Antwort-Element (engl. Interferon-sensitive response element)
Jak	Janus-Kinase
KM	Knochenmark
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MACS	engl. magnetic activated cell sorting
MCMV	Murines Cytomegalievirus
M-CSF	engl. macrophage colony stimulating factor
MG	Mikroglia
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
mm	Millimeter
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MZ	Marginalzone
MΦ	Makrophage
n	Anzahl verwendeter individueller Tiere/Proben
NF-M	Neurofilament-Medium
ng	Nanogramm

OSCs	Organotypische zerebelläre Schnittkulturen (engl. organotypic cerebellar slice cultures)
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. Pathogen-associated molecular pattern)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle (engl. plasmacytoid dendritic cell)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein Komplex
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque bildende Einheiten (engl. Plaque forming units)
pg	Pikogramm
pi	<i>post infectionem</i> , nach Infektion
PLP	Proteolipid-Protein
poly(I:C)	Polyriboinosinsäure-Polyribocytidylsäure
PRR	Pathogen-spezifischer Mustererkennungsrezeptor (engl. pattern recognition receptor)
PTX	Pertussis-Toxin
qRT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (engl. quantitative real-time PCR)
RNS	Ribonukleinsäure
RP	rote Pulpa
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SA	Streptavidin
Sa	Substantia alba, weiße Substanz
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Sg	Substantia grisea, graue Substanz
ss	einzelsträngig (engl. single-stranded)
Stat	signaltransduzierende Transkriptionsaktivatoren (engl. signal transducer and activator of transcription)
T _H	T Helferzellen
TLR	Toll like Rezeptor
TNB	Tris sodium blocking

TNF	Tumornekrosefaktor
Tyk	Tyrosin-Kinase
U	Einheiten (engl. units)
u. a.	und andere
v/v	Volumen/Volumen (engl. volume per volume)
w/v	Gewicht/Volumen (engl. weight per volume)
WP	weiße Pulpa
x	vielfaches
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (engl. yellow fluorescent protein)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
ϵ	epsilon
ζ	zeta
κ	kappa
τ	tau
ω	omega

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde unter Beachtung der “Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis” an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf erstellt und weder in der vorgelegten noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den 08.03.2018

(Ann-Kathrin Pulm)

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen und mich auf diesem Weg begleitet haben.

Als erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Stefanie Scheu bedanken. Steffi, vielen Dank, dass du mir ein so spannendes Thema zur Verfügung gestellt hast und an meinen Forschergeist geglaubt hast. Danke für die Betreuung, Korrektur und das Vertrauen in diese Arbeit.

Ich möchte mich ebenfalls bei meinem Ko-Referenten Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt vom Institut für Biochemie I an der Heinrich-Heine Universität, für die Durchsicht der Arbeit, bedanken.

Dank gilt an dieser Stelle auch Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer, der mit seiner Insti- tutsstruktur und dem stetigen Austausch mit seinen Mitarbeitern einen wirklich angenehmen Arbeitsplatz geschaffen hat. Es war eine tolle Zeit und ich weiß aus Erfahrung, dass das keine Selbstverständlichkeit ist.

Vielen Dank an meine Mentoren Frau Dr. Judith Alferink, für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht und den Zuspruch all die Zeit, Frau Dr. Anne Mausberg und Herrn Prof. Dr. Ingo Drexler, für den Austausch und die konstruktiven Anregungen im Verlauf dieser Arbeit.

Meiner Arbeitsgruppe gilt besonderer Dank, allen vorweg unserem Sonnenschein Sonja, die den Begriff TA für mich neu geprägt hat. Du bist einfach ein technisches Allround-Talent; aber natürlich auch Anja, Shafaqat, Alex, Lisa und den ehemaligen Magda und Jens. Auch den anderen Kollegen aus dem Institut möchte ich für diese unvergessliche Zeit, all die Leckereien, die überaus lustigen und etwas ernsteren Gespräche, die Partys und überhaupt den ganz normalen Alltagswahnsinn danken – Sabine, Pia, Julia N., Uschi, Nicole, Julia M., Dana und allen anderen.

Reiner Schneider und Magda, vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und das daraus resultierende Paper, ihr wart super Kooperationspartner und Kollegen.

Ohne Freunde sind solche Zeiten nur halb so erträglich, deshalb möchte ich einigen von ihnen ganz besonders danken: Tina, Sandra, Caro, Thomas, Peter, G.,

Danksagung

Thomas, Mia, Andy, Sarah, Robert, Gosia und David, eure einzigartige "Freumilienschaft" ist unbezahlbar!

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die mich bedingungslos unterstützt und immer wieder aufgebaut hat. Und ja ich gebe es zu, ich war ein Boomerang-Kind, danke Mama.

Danke Oma Martha, dass du mir trotz oder gerade wegen deiner voranschreitenden Demenz, immer wieder gezeigt hast, dass es eigentlich reicht sich ein kleines Stück seiner eigenen Wirklichkeit zu erhalten, um glücklich zu sein. Dir sei diese Arbeit gewidmet.

Danke Simon für das Glück, das uns nun erwartet. Du hast es geschafft aus einem Duracell-Hasen einen Menschen mit gesundem Ruhepuls zu machen – Ich liebe Dich.