

Zellspezifische Funktionen des Typ 1 Interferonrezeptors bei der
experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
“Doctor rerum naturalium“
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

HAUKE SCHMIDT
aus Göttingen

Göttingen 2007

D 7

Referent: Prof. Dr. D. Doenecke

Korreferent: Prof. Dr. U. Groß

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2007

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | IV |
| 1. EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 Multiple Sklerose..... | 1 |
| 1.2 Das Typ 1 Interferonsystem..... | 3 |
| 1.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis... .. | 5 |
| 1.4 Zielsetzung..... | 8 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN..... | 9 |
| 2.1 Chemikalien..... | 9 |
| 2.2 Nährmedien für die Kultivierung von Zellen..... | 10 |
| 2.3 Antibiotika und Proteaseinhibitoren..... | 10 |
| 2.4 Nachweis- und Reinigungssysteme..... | 10 |
| 2.5 Enzyme und Zytokine..... | 10 |
| 2.5.1 DNA-/RNA modifizierende Enzyme..... | 10 |
| 2.5.2 Zytokine..... | 10 |
| 2.5.3 Sonstige Enzyme..... | 11 |
| 2.6 Verwendete Mauslinien..... | 11 |
| 2.7 Induktion der EAE in Mäusen..... | 11 |
| 2.7.1 Herstellung des Inokulums..... | 11 |
| 2.7.2 Immunisierung von Mäusen..... | 12 |
| 2.7.3 Adoptiver Transfer enzephalitogener T-Zellen (passive EAE)..... | 12 |
| 2.7.4 Klinische Evaluation der Mäuse..... | 13 |
| 2.8 Standardtechniken zum Arbeiten mit DNA..... | 14 |
| 2.8.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Mausgeweben..... | 14 |
| 2.8.2 Polymerase chain reaction (PCR)..... | 14 |
| 2.8.3 Agarose-Gelelektrophorese..... | 14 |
| 2.9 Isolationsmethoden verschiedener Zelltypen..... | 16 |
| 2.9.1 Blutentnahme an der Maus..... | 16 |
| 2.9.2 Isolierung und Stimulierung von Lymphozyten aus Lymphknoten..... | 16 |
| 2.9.3 Isolierung von Thioglycolat-induzierten, peritonealen Makrophagen..... | 16 |
| <i>Stimulation von peritonealen Makrophagen mit verschiedenen Liganden.....</i> | <i>17</i> |
| <i>Myelinphagozytose peritonealer Makrophagen.....</i> | <i>17</i> |
| 2.9.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem ZNS..... | 18 |

| | | |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.9.5 | Isolierung und Stimulierung von B-Zellen..... | 19 |
| 2.10 | Histologie..... | 19 |
| 2.10.1 | Perfusion von Mäusen..... | 19 |
| 2.10.4 | Histopathologische Analyse..... | 20 |
| 2.11 | Herstellung von Hirnhomogenaten zur Zytokinbestimmung..... | 20 |
| 2.12 | Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)..... | 21 |
| 2.13 | Genexpressionsanalysen..... | 21 |
| 2.13.1 | Isolierung und Aufreinigung von RNA..... | 21 |
| 2.13.2 | Reverse Transkription..... | 22 |
| 2.13.3 | Quantitative PCR..... | 22 |
| 2.14 | Durchflusszytometrie..... | 24 |
| 2.14.1 | Markierung von Oberflächenantigenen..... | 24 |
| 2.14.2 | Messung und Auswertung der Zellpopulationen..... | 24 |
| 3. | EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE..... | 26 |
| 3.1 | Endogene, krankheitsassoziierte Typ 1 IFN Produktion..... | 27 |
| 3.1.1 | Krankheitsassoziierte IFN- β Produktion im ZNS..... | 27 |
| 3.1.2 | Expression Typ 1 IFN-abhängiger Gene im ZNS..... | 27 |
| 3.2 | Die Funktion des IFNAR während der EAE..... | 28 |
| 3.2.1 | Klinischer Verlauf der EAE in IFNAR ^{-/-} Mäusen..... | 28 |
| 3.2.2 | Vergleichende, histopathologische Analysen zwischen WT und IFNAR ^{-/-} | 30 |
| 3.2.3 | T-Zell Zytokinprofil in der Peripherie und im ZNS..... | 30 |
| 3.2.4 | Vergleichende Genexpressionen im ZNS..... | 32 |
| 3.2.5 | Adoptiver Transfer von MOG-spezifischen T-Zellen..... | 33 |
| 3.3 | Charakterisierung der spezifischen IFNAR Deletionen..... | 35 |
| 3.3.1 | Southern Blot Analyse der verschiedenen zellspezifischen Deletionen..... | 36 |
| 3.3.2 | FACS-Analyse der verschiedenen zellspezifischen Deletionen..... | 38 |
| 3.4 | Die Rolle des IFNAR im ZNS während der EAE..... | 39 |
| 3.4.1 | Klinischer Verlauf der EAE in IFNAR ^{fl/fl} NestinCre Mäusen..... | 39 |
| 3.4.2 | Histopathologische Analyse der IFNAR ^{fl/fl} NestinCre Mäuse..... | 41 |
| 3.5 | T-Zell-abhängige Funktion des IFNAR während der EAE..... | 41 |
| 3.5.1 | Klinischer Verlauf der EAE in IFNAR ^{fl/fl} CD4Cre Mäusen..... | 41 |
| 3.5.2 | Histopathologische Analyse der IFNAR ^{fl/fl} CD4Cre Mäuse..... | 42 |
| 3.5.3 | Antigen-abhängige T-Zellproliferation und Zytokinproduktion..... | 43 |
| 3.5.4 | FACS-Analyse ZNS-infiltrierender T-Zellen..... | 44 |
| 3.6 | B-Zell-abhängige Funktion des IFNAR während der EAE..... | 45 |

| | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6.1 | Klinischer Verlauf der EAE in IFNAR ^{fl/fl} CD19Cre Mäusen..... | 45 |
| 3.6.2 | Histopathologische Analyse der IFNAR ^{fl/fl} CD19Cre Mäuse..... | 46 |
| 3.6.3 | Antigen-abhängige IL-10 Produktion von B-Zellen..... | 47 |
| 3.7 | Die Funktion von IFNAR auf myeloischen Zellen während der EAE..... | 48 |
| 3.7.1 | Klinischer Verlauf der EAE in IFNAR ^{fl/fl} LysMCre Mäusen..... | 48 |
| 3.7.2 | IFNAR-abhängige MHCII Expression auf Makrophagen <i>in vitro</i> | 49 |
| 3.7.3 | IFNAR-abhängige MHCII Expression auf Makrophagen <i>in vivo</i> | 50 |
| 3.7.4 | Der Einfluss von IFN-β auf die Myelinphagozytose..... | 52 |
| 3.7.5 | Der Einfluss von IFN-β auf die Chemokinproduktion von Makrophagen..... | 54 |
| 3.7.6 | T-Zellproliferation und Zytokinproduktion in IFNAR ^{fl/fl} LysMCre Mäusen..... | 55 |
| 4. | DISKUSSION..... | 57 |
| 4.1 | Die Bedeutung von Tiermodellen für das Verständnis der MS..... | 57 |
| 4.1.1 | Pathologische Mechanismen in der EAE und der MS im Vergleich..... | 57 |
| 4.1.2 | Das Typ 1 IFN System der Maus und des Menschen..... | 59 |
| 4.1.3 | Typ 1 IFN assoziierte, autoimmunologische Prozesse..... | 60 |
| 4.2 | Die schützende Funktion des IFNAR in der EAE..... | 61 |
| 4.2.1 | Der Einfluss des IFNAR auf die EAE | 61 |
| 4.2.2 | Zellspezifische Funktionen des Typ 1 IFN Systems..... | 65 |
| 4.2.3 | Hypothese zur Funktionsweise des IFNAR während der EAE und molekulare Mechanismen..... | 69 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 72 |
| 6. | SUMMARY..... | 74 |
| 7. | LITERATURVERZEICHNIS..... | 75 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------|------------------------------------------------------|
| °C | Grad Celsius |
| μ | mikro |
| 2'5' OAS | 2'5' Oligoadenylatcyclase |
| 2D | zweidimensional |
| A | Absorptionskoeffizient |
| Ab. Elong. | abschließende Elongation |
| Abb. | Abbildung |
| Ag | Antigen |
| akkumul. | akkumulativer |
| APC | Allophycocyanin |
| APP | <i>β-amyloid precursor protein</i> |
| Astroz. | Astrozyten |
| bp | Basenpaare |
| c.p.m. | <i>counts per minutes</i> |
| ca. | circa |
| CCL | CC Motiv Chemokin Ligand |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| cDNA | copy DNA |
| CFA | <i>complete freund's adjuvant</i> |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CpG-DNA | unmethylierte Cytidin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotide |
| CXCL | CXC Motiv Chemokin Ligand |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| D-MEM | Dulbecco's <i>modified Eagle's medium</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonukleinase |
| dNTP | Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat |
| EAE | experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis |
| EDTA | Ethylendiamin-Tetra-Acetat |
| ELISA | <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| ELISPOT | <i>enzyme linked immuno spot technique</i> |
| et al. | et alii (und andere) |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting</i> |

| | |
|--------------|-------------------------------------------------|
| FCS | Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| fl/fl | flox/flox |
| flox | LoxP flankiert |
| g | Gramm |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3Phosphat-Dehydrogenase |
| GFAP | <i>glial fibrillary acidic protein</i> |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| h | Stunde |
| HLA | <i>human leukocyte antigen</i> |
| i.p. | intraperitoneal |
| IFA | <i>incomplete freund's adjuvant</i> |
| IFN | Interferon |
| IFNAR | Typ1 Interferon Rezeptor |
| IL | Interleukin |
| Init. Denat. | Initiale Denaturierung |
| IP10 | <i>interferon inducible protein</i> |
| IRF | <i>interferon regulatory factor</i> |
| ISG | <i>interferon stimulated gene</i> |
| ISRE | <i>interferon-stimulated response element</i> |
| JAK | Januskinase |
| kb | Kilobasem |
| KLH | <i>keyhole limpet hemocyanine</i> |
| KO | <i>knockout</i> |
| l | Liter |
| LFB | <i>luxol fast blue</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LT | Lymphotoxin |
| LysM | LysozymM |
| M | milli |
| m | milli |
| M | Molar |
| MACS | <i>magnetic cell separation</i> |
| max. | maximaler |
| MBP | Myelin basisches Protein |
| MCP-1 | <i>monocyte chemoattractant protein</i> |
| MFI | <i>mean fluorescence intensity</i> |

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |
| min | Minute |
| MIP | <i>macrophage inflammatory protein</i> |
| mittl. | mittlerer |
| MOG | Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein |
| MS | Multiple Sklerose |
| n | nano |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaN ₃ | Natriumazid |
| NCBI | <i>national center for biotechnology information</i> |
| Neo | Neomycin |
| NesCre | NestinCre |
| Neuron. | Neuronen |
| OD | Optische Dichte |
| Oligod. | Oligodendrozyten |
| P | piko |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH-Wert | negativ dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration |
| PLP | Proteolipid Protein |
| PTX | PertussisToxin |
| RANTES | <i>regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RORgt | (<i>RAR-related orphan receptor gamma t</i>) |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| s | Sekunde |
| SDS | <i>sodiumdodecyl sulfate</i> |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> |
| STAT | <i>signal transducer and activator of transkription</i> |
| Sympt. | Symptome |
| Tab. | Tabelle |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |

| | |
|------|-----------------------------------|
| TGF | <i>transforming growth factor</i> |
| Th | T _{Helfer} |
| TM | Warenzeichen (<i>trademark</i>) |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tyk2 | Tyrosinkinase 2 |
| U | Unit (Enzymeinheiten) |
| u.a. | unter anderem |
| USA | <i>united states of america</i> |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| WT | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentralnervensystem |

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), welche erstmalig 1867 von Jean Martin Charcot beschrieben wurde (Ordenstein, 1867). Charcot beobachtete bei Patienten mit episodisch auftretenden, neurologischen Dysfunktionen eine perivasculäre Infiltration entzündlicher Zellen in die weiße Substanz des Gehirns und des Rückenmarks. Einen weiteren Hinweis auf einen entzündlichen Prozess erbrachte Kabat im Jahre 1948, als er bei MS Patienten oligoklonale Immunglobuline im Liquor (Hirnflüssigkeit) entdeckte, wie sie sonst nur bei Infektionen wie Neurosyphilis oder Neuroborreliose zu finden waren.

Obwohl über die Ursachen der MS wenig bekannt ist, konnte die Erkrankung im Laufe der Zeit ausführlich charakterisiert werden. So stellen sich typischerweise die ersten klinischen Symptome zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr ein und treffen Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer. Mit einer Prävalenz von 1:1000 ist die MS damit die häufigste entzündliche Entmarkungserkrankung des ZNS in Nordamerika und Nordeuropa. Grundsätzlich wird zwischen drei Verlaufsformen unterschieden: 85-90% der Patienten entwickeln eine schubförmig-remittierende Form, bei der es zu einem spontanen Auftreten klinischer Symptome kommt. Diese äußern sich häufig in Lähmungserscheinungen, Sensibilitäts- und Sehstörungen, ferner Blasenstörungen und Müdigkeit u.a. Sie können sich in einem Zeitraum von Stunden bis einigen Tagen entwickeln und über Tage bis Wochen andauern. Es folgt dann eine Verbesserung der Symptome bis zum nächsten Schub. Bei einer zweiten Variante, der selteneren primär progredienten Form, kommt es zu einem sukzessiven Fortschreiten des klinischen Verlaufs ab dem Beginn der ersten Symptome. In der dritten Verlaufsform geht die schubförmig-remittierende Form nach einigen Schüben in eine progrediente Variante über und wird deshalb sekundär-progrediente Form genannt (Frohman et al., 2006; Sotgiu et al., 2004).

Untersuchungen zur Ergründung genetischer und umweltbedingter Risiken weisen auf geographische, ethnische und klimabedingte Ursachen hin, welche die MS begünstigen können. Zur Erforschung genetischer Einflüsse werden Kandidatengene gesucht, die möglicherweise an der Entstehung der MS beteiligt sind. Dabei konnte jedoch erst ein Gen in der HLA Region ausgemacht werden, dessen Haplotyp bei MS Patienten gehäuft auftritt (Rubio et al., 2007). Epidemiologische Studien zeigten, dass das Risiko einer Erkrankung bei Halbgeschwistern eines MS Patienten 1,3 % beträgt

gegenüber 3,4 % eines Geschwister und es so zu einer familiären Häufung kommen kann (Sadovnick et al., 1996). In Studien an monozygoten Zwillingen stieg das Erkrankungsrisiko auf 25,3 %, wenn ein Zwillingsgeschwister bereits erkrankt war (Willer et al., 2003). Als umweltbedingte Risikofaktoren werden u.a. eine steigende Inzidenz zu den Erdpolen, höhere Prävalenz in Nordeuropa und Nordamerika, Industrialisierung und Infektionen diskutiert.

Es ist allgemein akzeptiert, dass die MS eine Autoimmunerkrankung ist, bei der es zu einer adaptiven Autoimmunantwort gegen Peptide der Myelinschichten kommt, welche von den Oligodendrozyten gebildet werden. Die Myelinschichten unterstützen die Weiterleitung von Aktionspotentialen und schützen neuronale Zellen vor axonaler Schädigung und Degeneration. Die Autoimmunreaktion führt zu einer Entzündung der weißen Substanz und zur Bildung von Läsionen, in denen es zum Verlust der Markscheiden und Oligodendrozyten und zur Bildung glialen Narbengewebes kommt. Die neurologischen Defizite werden jedoch durch die Schädigung und Degeneration der Axone hervorgerufen, welche mit der Entzündung einhergehen. Man geht davon aus, dass myelinspezifische, autoreaktive $CD4^+$ T-Zellen zu Th1-Zellen ausdifferenzieren, welche normalerweise antimikrobielle Effektorfunktionen von Makrophagen aktivieren. Bei der MS hingegen richtet sich die Th1 Antwort gegen die Oligodendrozyten und Markscheiden im ZNS und führt dort zur Aktivierung von infiltrierenden Makrophagen und Mikroglia. Die aktivierten $CD4^+$ T-Zellen können bei MS Patienten im Blut und in den entzündlichen Infiltraten im ZNS nachgewiesen werden (Scholz et al., 1998; Lovett-Racke et al., 1998). Es wurden jedoch auch aktivierte, myelinspezifische $CD8^+$ zytotoxische T Lymphozyten entdeckt, welche bei Infektionen Zielzellen lysieren und im Falle der MS möglicherweise die Oligodendrozyten direkt schädigen (Crawford et al., 2004; Zang et al., 2004). Umstritten ist eine pathophysiologische Funktion von B-Zellen, welche sowohl im Liquor als auch in den entzündlichen Infiltraten zu finden sind (Frohman et al., 2006). Die klinische und histologische Heterogenität der Erkrankung lassen vermuten, dass neben der beschriebenen Th1 Autoimmunität noch weitere, immunologische Mechanismen zur Entstehung der MS beitragen. Genexpressionsanalysen unterstützen die These, dass neben Th1 auch Th17 und B-Zell vermittelte Immunantworten an der Pathogenese beteiligt sind (Lock et al., 2002).

Letztlich werden bei der Entstehung der MS auf unbekannte Weise zwei wesentliche Schutzmechanismen aufgehoben: Erstens scheint die Fähigkeit, körpereigene und körperfremde Antigene voneinander zu unterscheiden, nicht mehr zu funktionieren („Immuntoleranz“). Obwohl im Thymus und im Blutkreislauf durch negative Selektion und verschiedene Mechanismen wie Anergie, Deletion u.a. autoreaktive T-Zellen

eliminiert werden, können bei MS Patienten aktivierte, myelinspezifische T-Zellen unter Umgehung der Kontrollmechanismen ihre Effektorfunktionen ausführen. Zweitens gehört das ZNS zu einer Reihe von Geweben (wie z.B. Auge, Hoden u.a.) mit reduzierter immunologischer Aktivierbarkeit und lokaler Immunsuppression („Immunprivileg“). Als Barriere dient dem ZNS die Blut-Hirn-Schranke, welche normalerweise das Eindringen von im Blut zirkulierenden Pathogenen und Toxinen verhindert und für eine streng regulierte Migration von Lymphozyten und kontrolliertem Transport von polaren Verbindungen sorgt. Diese Barriere ist bei MS Patienten in den akuten Phasen der Erkrankung durchlässig für autoreaktive Zellen und inflammatorische Monozyten (Correale und Villa, 2007).

1.2 Das Typ 1 Interferonsystem

Obwohl die MS eine unheilbare Erkrankung ist, wurden eine Reihe von Therapien entwickelt, die die Progression der Erkrankung verlangsamen. Grundsätzlich werden hier zwei Ansätze, die Immunsuppression und die Immunmodulation, verfolgt. Eines der wichtigsten immunmodulatorischen Therapien ist die Applikation von Interferon- β (IFN- β), welches zu einer Verringerung der Schubrate und der Läsionen im ZNS führt. Interferone sind Zytokine, welche in den frühen Phasen von Infektionen von verschiedenen Zelltypen gebildet werden und sich u.a. durch immunmodulatorische, antivirale und antitumorale Eigenschaften auszeichnen (Bogdan et al., 2004). Erstmals wurden sie 1957 von Isaacs und Lindenmann beschrieben als eine „Aktivität“, welche von Virus infizierten Zellen ausgeschüttet wird und andere Zellen vor Infektionen schützt. 1979 gelang im Labor von Charles Weissmann die Herstellung von rekombinantem Typ 1 IFN, so dass erstmals beliebige Mengen für klinische Anwendungen zur Verfügung standen (Nagata et al., 1980) und schließlich 1993 zur Entwicklung einer Therapie für MS führte (Paty und Li, 1993).

Das Interferonsystem wird in zwei Gruppen unterteilt: Die Typ 1 IFN, zu denen IFN- β und je nach Spezies ca. 12-17 IFN- α Subtypen gehören, und das Typ 2 IFN, repräsentiert durch IFN- γ . Alle Typ 1 IFN binden an den ubiquitär exprimierten Typ 1 IFN Rezeptor (IFNAR), welcher von den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 gebildet wird (Pestka et al., 2004). Die Bindung eines Typ 1 IFN an den IFNAR führt zur Aktivierung des JAK-STAT Signalwegs (Abb. 1.0). Er ist der erste und vorherrschende Signalweg, dessen Aktivierung durch die Bindung der IFN an ihre Rezeptoren beschrieben wurde. Die JAK-STAT Proteine sind eine Gruppe von 4 Tyrosinkinasen

(JAK) und 7 Transkriptionsaktivatoren (STAT), welche die Signaltransduktion von mindestens 40 Zytokinrezeptoren bestimmen (Murray 2007). Die Signalkaskaden des IFNAR können allerdings in verschiedenen Zelltypen vom klassischen Signalweg abweichen und alternative STAT Moleküle aktivieren. Überdies gibt es neben den JAK-STAT Kaskaden weitere Signalwege, welche durch Typ 1 IFN über den IFNAR induziert werden (Platanias 2005).

Obwohl in Deutschland bis zu 50% der MS Patienten mit IFN- β behandelt werden, ist derzeit unklar, auf welche Weise IFN- β wirkt und warum nur ca. 30-50% der Patienten auf die Therapie ansprechen. Die Suche nach dem Wirkungsmechanismus gestaltet sich auch deshalb als schwierig, da die Interferone äußerst pleiotrope Funktionen ausüben und der IFNAR in allen Geweben und verschiedenen Zelltypen exprimiert wird.

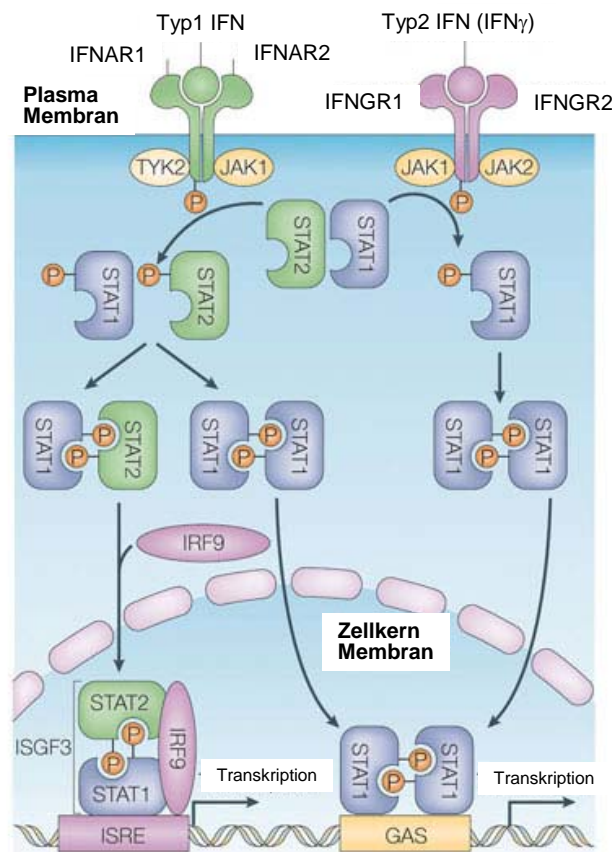


Abb. 1.0: JAK-STAT Aktivierung durch Typ 1 und Typ 2 IFN. Die Bindung von Typ 1 IFN an den IFNAR führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase 2 (TYK2) und der Januskinase 1 (JAK1), welche mit dem Rezeptor assoziiert sind. Die Aktivierung hat eine Tyrosin Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 (*signal transducer and activator of transcription*) zur Folge, welche einen Komplex mit IRF9 (*IFN-regulatory factor 9*) bilden und in den Zellkern translozieren. Dort binden sie an ISRE (*IFN-stimulated response element*) und initiieren die Transkription zahlreicher Gene

1.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Viele Erkenntnisse über Autoimmunerkrankungen beruhen auf Modellen, mit denen versucht wird, menschliche Erkrankungen im Tier experimentell darzustellen. Ein solches Modell ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), eine inflammatorische Autoimmunerkrankung, die durch Immunisierung mit Peptiden des Myelins induziert wird. Die so erzeugte adaptive Immunantwort führt zur Entzündung des ZNS und zu neurologischen Defiziten wie Tremor (Zittern) und Lähmungen. Da mit der EAE verschiedene neuropathologische und neurobiologische Aspekte der MS reproduziert werden können, wird sie als Tiermodell der MS verstanden (Gold et al., 2006). Die historische Entwicklung der EAE basiert auf Beobachtungen von Louis Pasteur, der mit inaktivierten Hirnhomogenaten aus Tollwut-infizierten Tieren Vakzinierungsversuche durchführte. Einige Tiere entwickelten fortschreitende Lähmungserscheinungen, welche er postvakzinelle Enzephalomyelitis nannte (Remlinger, 1905). 1933 beschrieben Rivers et al. die Induktion von Rückenmarksentzündungen von Rhesusaffen mit Hirngewebe aus Kaninchen. Da das verwendete Inokulum von gesunden Tieren stammte, wurden die klinischen Symptome direkt auf Bestandteile der Hirnsubstanz und nicht etwa auf Pathogene zurückgeführt. Während Rivers noch bis zu 80 Injektionen über einen Zeitraum von mehreren Monaten für eine Induktion der Entzündung brauchte, konnten 1951 Kabat et al. durch die Vermischung des Hirnextrakts mit einem auf Mineralöl basierendem Adjuvans (Freundsches Adjuvans) die Erkrankung mit nur einer Injektion induzieren. 1955 entdeckten Lee und Olitsky, dass die Zugabe von hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* in das Freundsche Adjuvans und Injektionen von Pertussistoxin die Immunantwort verstärken. Schließlich konnte Paterson et al. 1960 die Erkrankung von immunisierten Tieren auf Empfängertiere durch den adoptiven Transfer von Lymphozyten übertragen. Patersons Arbeiten verdeutlichten, dass die Entzündung allein durch Lymphozyten induziert werden kann und dass das Adjuvans nicht direkt an der Pathogenese beteiligt ist.

Obwohl die EAE in zahlreichen Tierarten etabliert ist, erfolgten viele Studien in der Vergangenheit an Meerschweinchen und Ratten. Jedoch kamen in den letzten Jahren durch die rasant steigende Zahl von transgenen- und „knockout“ Mäusen immer häufiger verschiedene Mausstämme zum Einsatz. Hier konnte insbesondere durch die zellspezifische Deletion oder Überexpression von Genen die Funktion bestimmter Proteine auf verschiedenen Zelltypen untersucht werden. Überdies konnte durch die Verwendung verschiedener Myelinantigene wie das Myelin-Basische-Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG) oder Proteolipid-Protein (PLP) eine große

Variabilität in die klinischen Verläufe und Histologien gebracht werden. Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell, die MOG₃₅₋₅₅ induzierte EAE in C57BL6/J Mäusen, führt zu einer chronischen Verlaufsform und einer T-Zell vermittelten Autoimmunität. Die Entzündung beschränkt sich in diesem Modell auf das Rückenmark und ist gekennzeichnet durch eine massive perivaskuläre und parenchymale Infiltration mononukleärer Zellen, welche hauptsächlich aus Makrophagen und T-Zellen bestehen. B-Zellen hingegen sind nur meningeal und perivaskulär in geringerer Zahl nachzuweisen. Für lange Zeit galt als gesichert, dass in diesem Mausmodell eine Th1 Autoimmunität dominiert, bei der IFN- γ - und IL-2 produzierende, MOG-spezifische T-Zellen durch Aktivierung peripherer Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten die Entzündungsprozesse vermitteln. Somit wurde mit der MOG-induzierten EAE in C57BL6/J Mäusen eine Autoimmunantwort geschaffen, wie sie auch bei der MS vorzuherrschen scheint. Inzwischen weiß man, dass bei der EAE neben Th1-Zellen auch IL-17 produzierende T-Zellen (Th17-Zellen) einen erheblichen Anteil an der Entzündung haben. Da Th17-Zellen eine höhere Enzephalitogenität haben, ist das Verhältnis von Th1- und Th17-Zellen entscheidend für den klinischen Verlauf der EAE (Langrish et al., 2005). Die Ausdifferenzierung der verschiedenen Th-Zellen wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zytokine gesteuert, deren Funktionen wiederum maßgeblich von den JAK-STAT Signalwegen bestimmt wird (Abb. 1.1). Unter bestimmten Bedingungen scheinen auch hier die Typ 1 IFN die Th-Zell Differenzierung zu beeinflussen (Nguyen et al., 2000), wobei die Funktion der Typ 1 IFN für autoimmunologische Prozesse, insbesondere im ZNS, nicht klar ist.

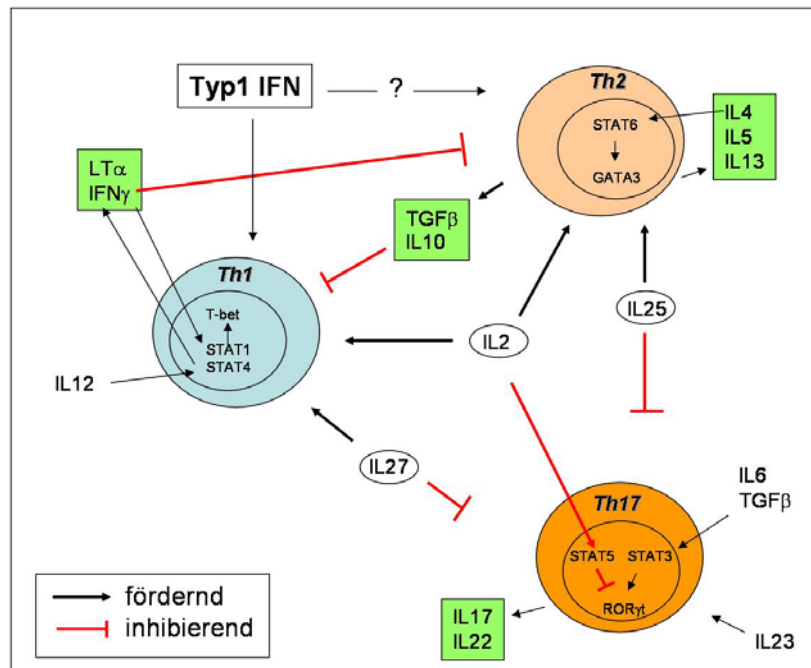


Abb. 1.1: Die Differenzierung von Effektor CD4+ T-Zellen wird durch verschiedene Zytokine, STAT Proteine und Transkriptionsfaktoren festgelegt. Die Differenzierung zu Th17-Zellen wird durch IL-23, IL-6 und TGF-β unterstützt. STAT3 Aktivierung induziert den Transkriptionsfaktor RORγt (RAR-related orphan receptor gamma t). IL-2, IL-25 und IL-27 inhibieren die Differenzierung zu Th17-Zellen. Th1 Differenzierung wird durch IL-2, IL-12-STAT4 und IFN-γ-STAT1 Signalwege begünstigt und durch TGF-β und IL-10 inhibiert. Unter bestimmten Bedingungen unterstützen auch Typ 1 IFN die Th1 Differenzierung. Die Th2-Zell Entwicklung wird durch IL-2 und IL-25 unterstützt. Das von den Th2-Zellen produzierte IL-4 aktiviert STAT6, welches die Th2 Entwicklung fördert. IFN-γ kann die Th2 Entwicklung inhibieren. Bei Autoimmunität wird eine Th1/Th2 Balance-Verschiebung durch Typ 1 IFN zugunsten von Th2 diskutiert. Die für die verschiedenen Th-Zellen charakteristischen Effektorzytokine sind grün unterlegt.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss und die Funktion des Typ 1 Interferonrezeptors auf die EAE, dem Tiermodell der MS, untersucht werden. Dabei sollen sowohl zellspezifische Funktionen als auch molekulare Mechanismen identifiziert werden, denen der Einfluss der Typ 1 Interferone zugrunde liegt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Applichem, Darmstadt, Deutschland

Isopropanol

BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

Pharm Lyse® lysing reagent

BD FACS™ lysing solution

Difco, Detroit, USA

Thioglycolat

M. tuberculosis hitzeinaktiviert

List laboratories, Campbell, USA

Pertussistoxin

Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethanol

PFA

NaCl

Sigma, München, Deutschland

β-Mercaptoethanol

IFA

Diethylether

Trypanblau

Ethidiumbromid

LPS

Triton X-100

SDS

Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tris

EDTA

2.2 Nährmedien für die Kultivierung von Zellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

RPMI 1640 Medium (Invitrogen)

2.3 Antibiotika und Proteaseinhibitoren

Penicillin (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Streptomycin (Biochrom)

Complete™ protease inhibitors (Boehringer Mannheim, Deutschland)

2.4 Nachweis- und Reinigungssysteme

MACS® cell separation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

Qiashredder (Qiagen, Hilden, Deutschland)

RNeasy® Mini Kit (Qiagen)

2.5 Enzyme und Zytokine

2.5.1 DNA-/RNA modifizierende Enzyme

DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

RNase Inhibitor RNasin® (Promega, Madison, USA)

Reverse Transkriptase SuperScript™ 1 (Invitrogen)

SYBR® Green Fluorescein Mix (Abgene, Epsom, UK)

Taq Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland)

2.5.2 Zytokine

IFN-β (Biogen Idec, Cambridge, USA)

IFN-γ (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

IL-12 (R&D Systems)

TNF-α (R&D Systems)

2.5.3 Sonstige Enzyme

Proteinase K (Roche Diagnostics)

Trypsin/EDTA Lösung (Biochrom)

2.6 Verwendete Mauslinien

Tab. 2.1: Mauslinien

| Mauslinie | IFNAR Deletion | Referenz/Herkunft |
|--------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|
| C57BL/6 | keine | Charles River labs |
| IFNAR ^{-/-} | Auf allen Zellen | Muller, U. et al., 1994 |
| IFNAR ^{fl/fl} | keine | U. Kalinke et al. |
| IFNAR ^{fl/fl} Nestin Cre | Astozyten, Oligodendrozyten, Neurone | U. Kalinke et al. |
| IFNAR ^{fl/fl} CD4 Cre | T-Zellen | U. Kalinke et al. |
| IFNAR ^{fl/fl} CD19 Cre | B-Zellen | U. Kalinke et al. |
| IFNAR ^{fl/fl} LysM Cre | Myeloide Zellen | U. Kalinke et al. |

Alle in Tabelle 2.1 aufgeführten Mauslinien waren auf C57BL/6 Hintergrund.

2.7 Induktion der EAE in Mäusen

2.7.1 Herstellung des Inokulums

Das komplette Freundschsche Adjuvans wurde angesetzt durch Zugabe von 100 mg hitzeinaktiviertem *M. tuberculosis* (2.1) in 10 ml inkompletten Freundschchem Adjuvans (2.1). Das Gemisch aus MOG, CFA und PBS wurde anschließend in eine 20 ml Spritze überführt und mit einem Gummistopfen verschlossen. Es erfolgte dann eine Homogenisierung bis zur Bildung einer milchig, trüben Emulsion (ca. 5 min) mit einem Sonopuls® Ultraschallgerät (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland). In Zeitabständen von ca. 40 sec wurde das Inokulum gekühlt, um eine zu hohe Temperaturentwicklung zu verhindern. Das Inokulum wurde auf 1 ml Spritzen (Luer-Lok™ Tip, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verteilt und bis zur Applikation auf Eis gelagert.

Standardvolumen und Zusammensetzung des Inokulums für eine Maus:

50 µl MOG₃₅₋₅₅ (4 mg/ml)

50 µl 1x PBS (steril)

100 µl CFA

2.7.2 Immunisierung von Mäusen

Die Immunisierung erfolgte durch Anästhesie der 6-8 Wochen alten Mäuse mit Diethylether (2.1) und subkutaner Injektion von 200 µl des Inokulums. Den Tieren wurden dann zweimal 300 µl (0,83 µg/ml) PTX (2.1), direkt nach der Immunisierung und nach 48 h, intraperitoneal (i.p.) injiziert.

2.7.3 Adoptiver Transfer enzephalitogener T-Zellen (passive EAE)

Bei einer passiven EAE werden Zellen aus aktiv immunisierten Mäusen in Rezipienten injiziert. Auf diese Weise kann die Erkrankung ohne Immunisierung der Empfängertiere induziert werden.

Für den adoptiven Transfer wurden Mäuse immunisiert und nach 11 Tagen die Milzen, die inguinalen und die axillären Lymphknoten entnommen. Sämtliche Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Milzen wurden mit den rauen Seiten sterilisierter Objektträger zerdrückt und die Splenozyten in sterilen Petrischalen aufgefangen. Die übrig bleibende Kapsel wurde mit autoklaviertem, eiskaltem PBS gespült, die Splenozyten aus 3 Milzen in einem 50 ml Sarstedt Röhrchen vereinigt und mit PBS aufgefüllt. Die Zellen wurden dann zentrifugiert (Eppendorf 5810 R, 1500 rpm, 5 min, 4 °C) und durch Resuspension in 1 ml 1x Pharm Lyse® Lysing Reagent (2.1) pro Milz eine Erythrozytenlyse durchgeführt (5-8 min, auf Eis). Die Lyse wurde durch Zugabe von 20 ml PBS gestoppt und die Zellsuspension mit einem 40 µm Zellsieb (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) filtriert. Die Lymphknoten wurden ebenfalls wie oben beschrieben zerdrückt und mit eiskaltem PBS gewaschen. Eine Erythrozytenlyse war hier nicht erforderlich.

Es wurde dann mit einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und erneut zentrifugiert. Für die Reaktivierung und Reifung der MOG-spezifischen, enzephalitogenen T-Zellen wurde dem supplementierten RPMI 1640 Medium (2.2) 15 µg/ml MOG₃₅₋₅₅ und 2,5 ng/ml rekombinantes IL-12 (2.5.2) zugesetzt. In diesem Medium wurden die Zellen auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und resuspendiert. 80 ml der Suspension wurden in 145/20 Petrischalen (Greiner bio-one,

Frickenhausen, Deutschland) ausplattiert und für 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) inkubiert.

Die Zellen wurden dann mit eiskaltem PBS und einem 25 mm Zellschaber (Sarstedt) von den Petrischalen abgespült, die Splenozyten und Lymphozyten vereinigt, in 50 ml Sarstedt Röhrchen zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C) und in 10 ml eiskaltem PBS aufgenommen. Für die Bestimmung der Zahl lebender Zellen wurden diese mit Trypanblau (2.1) angefärbt und mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellen wurden dann mit eiskaltem PBS auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. In der Regel wurde jeder Maus 1 x 10⁷ Zellen in 300µl PBS i.p. injiziert. Das PTX (2.1) wurde, wie unter 2.2.2 beschrieben, 3 h nach dem Transfer der Zellen appliziert.

2.7.4 Klinische Evaluation der Mäuse

Die Versuchsmäuse wurden am Tag der Immunisierung markiert und eingewogen. Ab dem 10. Tag nach der Immunisierung wurden täglich Gewicht und klinische Symptome der Mäuse nach einem klinischen EAE Score dokumentiert. In der akuten Phase der Erkrankung wurde die Ernährung der Tiere bis zur Remission auf Breifütterung umgestellt. Mäuse mit einem klinischen EAE Score von 3,5 wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen aus dem Experiment genommen und euthanisiert (Abbruchkriterium).

Klinischer EAE Score:

- 0: keine klinischen EAE Symptome
- 0,5: partielle Schwanzlähmung
- 1,0: komplette Schwanzlähmung
- 1,5: leichte Hinterbeinschwäche
- 2,0 fortgeschrittene Hinterbeinschwäche, Ataxie
- 2,5 zusätzlich unilaterale Hinterbeinlähmung
- 3,0 totale, bilaterale Hinterbeinlähmung
- 3,5 totale, bilaterale Hinterbeinlähmung mit unilateraler Vorderbeinschwäche
- 4,0 Tetraparese
- 5,0 Tod

2.8 Standardtechniken zum Arbeiten mit DNA

Die Northern- und Southern Blot Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Klaus Peter Knobloch vom Institut für Molekulare Pharmakologie der Charité, Berlin durchgeführt.

2.8.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Mausgeweben

Die Gewebeprobe der Mäuse wurden mit 200 µl Gewebelysepuffer und 5 µl, 20 mg/ml Proteinase K (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) auf einem Heizblock für 2 h inkubiert (Eppendorf comfort, 55 °C, 600 rpm). Das verdaute Gewebe wurde zentrifugiert (Eppendorf 5415 R, 5 min, 13200 rpm), die im Überstand gelöste DNA in ein neues, autoklaviertes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit gleichem Volumen 100 % Isopropanol (2.1) gefällt. Die DNA wurde zentrifugiert und mit 200 µl 70 % Ethanol (2.1) gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde bei 55°C auf dem Heizblock für 3 min getrocknet und die DNA in 200 µl autoklaviertem ddH₂O gelöst.

Gewebe-Lyse-Puffer:

| |
|------------------------|
| 100 mM TrisHCl, pH 8,5 |
| 5 mM EDTA |
| 200 mM NaCl |
| 0,2 % SDS |

2.8.2 Polymerase chain reaction (PCR)

Von den in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden IFNAR^{-/-} und IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäuse am Institut für Neuropathologie gezüchtet und genotypisiert.

Standard PCR Reaktionsansatz:

| | |
|---------------------------|---------|
| H ₂ O | 10,3 µl |
| 5x PCR Puffer | 5,0 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1,5 µl |
| dNTP (1,25 mM) | 5,0 µl |
| 5' primer (50 µM) | 0,5 µl |
| 3' primer (50 µM) | 0,5 µl |
| Taq Polymerase (5 U/µl) | 0,2 µl |

Tab. 2.2: Primer und Produkte für die IFNAR^{-/-} Genotypisierung

| Name | Sequenz | Produkt (kp) | |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------------|
| | | wt | IFNAR ^{-/-} |
| UM4 UM5 | 5' AAGATGTGCTGTTCCCTTCCTCTGCTCTGA 3' 5' ATTATTAAGAAAAGACGAGGCGAAGTGG 3' | 0,15 | 1,3 |
| Neo for Neo rev | 5' TTCCATTGCTCAGCGGTGCT 3' 5' TTGTCAAGACCGACCTGTCCGGT 3' | - | 0,37 |

Tab. 2.3: Primer und Produkte für die IFNAR^{fl/fl} LysMCre Genotypisierung

| Name | Sequenz | Produkt (kb) | |
|----------------|-----------------------------------------------------------|--------------|---------------|
| | | fl/fl | fl/fl LysMCre |
| LysM1 LysM2 | 5' CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC 3' 5' TTACAGTCGGCCAGGCTGAC 3' | 0,35 | 1,7 |
| Cre8 LysM1 | 5' CCCAGAAATGCCAGATTACG 3' s.o. | - | 0,7 |

Tab. 2.4: PCR Programme

| Programm | UM4/UM5 | Neo for/Neo rev | LysM1/LysM2 | LysM1/Cre8 |
|---------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|
| Init. Denat. | 94 °C 5 min | 94 °C 2 min | 94 °C 5 min | 94 °C 5 min |
| Denaturierung | 94 °C 30 sec | 94 °C 20 sec | 94 °C 30 sec | 94 °C 30 sec |
| Annealing | 58 °C 30 sec | 60 °C 45 sec | 58 °C 30 sec | 58 °C 30 sec |
| Elongation | 72 °C 30 sec | 72 °C 45 sec | 72 °C 30 sec | 72 °C 30 sec |
| Zyklen | 35 | 28 | 30 | 30 |
| Ab. Elong. | 72 °C 5 min | 72 °C 5 min | 72 °C 5 min | 72 °C 5 min |
| Pause | 4 °C | 4 °C | 4 °C | 4 °C |

Die Reaktionen wurden in einem programmierten PCR-Block inkubiert (Biometra T3 Thermocycler, Göttingen, Deutschland)

2.8.3 Agarose-Gelelektrophorese

Nach Beendigung der PCR wurden die Amplifikate nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch getrennt. Dazu wurden 2 %ige Agarosegele (MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland) mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (2.1) gegossen und in eine mit 1xTAE Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 7,9; 2 mM EDTA) gefüllte Gelkammer gegeben. Die Proben wurden zusammen mit einem 100 bp DNA-Längenstandard (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in die Geltaschen aufgetragen und bei einer Spannung von

100 V für 30 min aufgetrennt. Die Photographie des Gels erfolgte in einer mit Digitalkamera bestückten UV-Leuchtkammer (Bio-Rad, München, Deutschland).

2.9 Isolationsmethoden verschiedener Zelltypen

2.9.1 Blutentnahme an der Maus

Das Blut von lebenden, mit Diethylether sedierten Mäusen wurde retroorbital abgenommen. Dazu wurden die Mäuse wie unter 2.7.2 beschrieben anästhesiert und eine heparinisierte Glaskapillare (Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland) hinter den Augapfel geschoben. Das Blut wurde in 0,5 ml FACS-Puffer aufgefangen und auf Eis gelagert.

2.9.2 Isolierung und Stimulierung von Lymphozyten aus Lymphknoten

Zur Messung der Antigen-abhängigen Immunantwort (T-Zell Priming) wurden Mäuse ohne PTX immunisiert. An gewünschten Zeitpunkten wurden die Tiere euthanisiert und die inguinalen und axillären Lymphknoten isoliert. Letztere wurden unter der Sterilbank mit sterilisierten Objektträgern homogenisiert, mit eiskaltem PBS in 15 ml Sarstedtröhrchen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) gewaschen und mit 40 µm Zellsieben (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) filtriert. Nach der Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in supplementiertem RPMI 1640 Medium (2.2) resuspendiert (2×10^6 Zellen/ml) und 100 µl Suspension (2×10^5 Zellen/Napf) in 96er Rundbodenplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) und parallel 96er Flachbodenplatten (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert. Die Zellen wurden dann bei verschiedenen MOG₃₅₋₅₅ Konzentrationen (1, 10 und 100 µg/ml) in einem Endvolumen von 200µl/Napf für 48 h bzw. 72 h im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Die Überstände wurden in 96er Flachbodenplatten überführt und bei -80 °C eingefroren.

2.9.3 Isolierung von Thioglycolat-induzierten, peritonealen Makrophagen

Für die Gewinnung von inflammatorischen, peritonealen Makrophagen wurde mit einer Insulinspritze (0,5 ml 29 G, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) 0,5 ml, 29 g/l Thioglycolat (2.1) in das Peritoneum der Maus injiziert. Nach 48 h wurde die Maus euthanisiert und das Peritoneum mit 2 ml eiskaltem, sterilen PBS gespült. Die

Zellsuspension wurde mit 10 ml sterilem PBS in einem 15 ml Sarstedt-Röhrchen aufgenommen und mit einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden dann zentrifugiert (Eppendorf 5810 R, 10 min, 1000 rpm) und in DMEM Medium (2.2) aufgenommen, welches mit 100 U/ml Penicillin (2.3), 100 µg/ml Streptomycin (2.3) und 5 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) supplementiert war. Die Zellen wurden dann für entsprechende Experimente ausplattiert und in einem Brutschrank (Heraeus, Berlin, Deutschland) bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Nach 1 h Inkubation wurden nicht adhärenente Zellen durch einen Mediumwechsel entfernt. Die Zellen wurden vor entsprechenden Experimenten für weitere 24 h inkubiert.

Stimulation von peritonealen Makrophagen mit verschiedenen Liganden

Zur Untersuchung des Einflusses von Typ 1 Interferonen auf die Zytokinproduktion wurden peritoneale Makrophagen in 96er Flachboden Platten (3 x 10⁴ Zellen/100µl und Napf) ausplattiert und für 18 h mit 10 ng/ml LPS (2.1), 1000 U/ml IFN-β (2.5.2), LPS + IFN-β, TNF-α (2.5.2), TNF-α + IFN-β (2.5.2) stimuliert. Die Überstände wurden dann bei -80 °C eingefroren.

Für die Untersuchung des Einflusses der Typ 1 und Typ 2 Interferone auf die MHC Klasse 2 Expression wurden peritoneale Makrophagen (4 x 10⁵ Zellen/500 µl und Napf) in 12er Napf Flachbodenplatten (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) ausplattiert und für 18 h mit 1000 U/ml IFN-β, 10 ng/ml IFN-γ (2.5.2) und IFN-β+ IFN-γ stimuliert. Die Zellen wurden 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit 300 µl Trypsin/EDTA (2.5.3) inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit supplementiertem DMEM Medium gestoppt, die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend für die FACS-Analyse verwendet.

Myelinphagozytose peritonealer Makrophagen

Zur quantitativen Analyse der Myelinphagozytose wurden peritoneale Makrophagen in 12er Napf Flächenbodenplatten (6 x 10⁵ Zellen/Napf) ausplattiert. Es wurde dann supplementierem DMEM Medium 4 µg/ml FITC-gekoppeltes Myelin zugesetzt und die Zellen damit für 30, 60 und 90 min inkubiert. Parallel wurde dem myelinhaltigen Medium 1000 U/ml IFN-β (2.5.2) zugesetzt und die Zellen wie beschrieben inkubiert.

Die Zellen wurden dann 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und trypsiniert, mit PBS gewaschen und für die FACS-Analyse verwendet.

Für die qualitative Analyse der Phagozytose wurden 3×10^5 Zellen/Napf in 24er Flachbodenplatten ausplattiert, welche mit 15 mm Deckgläsern (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) versehen waren. Nach Beendigung der Phagozytose wurden die Zellen 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und für 1 h mit $0,1 \mu\text{M}$ LysoTracker® red (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in DMEM Medium inkubiert. Die Zellen wurden dann 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 0,3 ml 4 % PFA (2.1) fixiert und lichtgeschützt bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Für die konfokale Mikroskopie wurden die Deckgläser aus den Flachbodenplatten entnommen, auf Objektträger platziert und vereinzelte Zellen bei 400facher Vergrößerung und Anregungen von 488 nm (FITC) bzw. 543 nm (LysoTracker) fotografiert.

2.9.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem ZNS

Zur Charakterisierung der zellulären Infiltrate im ZNS wurden mononukleäre Zellen aus erkranktem Rückenmarksgewebe isoliert und aufgereinigt. Dazu wurden Versuchsmäuse euthanisiert, Rückenmark und Hirnstamm freipräpariert und in eiskaltem PBS aufbewahrt. Das Gewebe wurde dann mit einem Stahlsieb und einem Stempel zerkleinert, in eiskaltem PBS aufgenommen, mit einem $40 \mu\text{l}$ Zellsieb (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gefiltert und in einem 50 ml Sarstedtröhrchen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) bei 1500 rpm und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml 70 % isotonischem Percoll (Biochrom, Berlin, Deutschland) resuspendiert. Zwischenzeitlich wurden für jede Präparation in 15 ml Sarstedtröhrchen ein Percollgradient vorbereitet, welcher aus einer 4 ml 37 % -und einer 4 ml 30 % Percoll Phase bestand. Mit einer 230 mm Pasteur Pipette (WU MAINZ, Deutschland) wurden diese Phasen mit der gewebehaltigen 70 % Percoll suspension unterschichtet. Der Ansatz wurde dann bei Raumtemperatur für 25 min bei 2000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5810R). Die Beschleunigung wurde auf Stufe 4 gedrosselt und die Rotorbremse ausgeschaltet, da eine zu hohe Beschleunigung und ein zu schnelles Abbremsen eine Durchmischung der Phasen hervorrufen könnte. Zelltrümmer und Erythrozyten befanden sich nach der Zentrifugation im Pellet, während das lipidreiche Myelin aufstieg. Mononukleäre Zellen sammelten sich in der Interphase zwischen der 70 % und 37 % Schicht und waren als ca. 3 mm dicke, ringförmige Schicht erkennbar. Der Überstand wurde vorsichtig bis zur mononukleären Zellschicht mit einer Pasteurpipette entfernt und die Zellen in ein 50 ml Starstedtröhrchen überführt. Es folgte ein Waschschrift mit 50 ml eiskaltem PBS und eine Resuspendierung in 2 bis 4

ml FACS-Puffer. Die Zellen wurden nun auf FACS-Röhrchen verteilt und für durchflußzytometrische Analysen oder ELISPOT Experimente verwendet.

2.9.5 Isolierung und Stimulierung von B-Zellen

Zur Messung der Antigen-abhängigen IL-10 Produktion von B-Zellen aus immunisierten Mäusen wurden Tiere verschiedener Genotypen immunisiert und nach 30 Tagen die Milzen isoliert. Diese wurden unter sterilen Bedingungen homogenisiert (siehe 2.7.3), anschließend mit Lysispuffer versetzt und die Zellen in sterilem FACS-Puffer resuspendiert. Es folgte eine B-Zell Aufreinigung mit dem anti-CD43 MACS® Cell Separation Kit (2.4) nach Anleitung des Herstellers. Die nach der Aufreinigung im Durchlauf verbleibenden B-Zellen wurden mit eiskaltem, autoklaviertem PBS gewaschen und durchflußzytometrisch auf Reinheit überprüft.

Nach der Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer-Zählkammer wurden die B-Zellen in supplementiertem RPMI 1640 Medium (2.2) mit MOG₃₅₋₅₅ (40 µg/ml), CD40-Antikörpern (10 µg/ml, BD Pharmingen) und MOG + CD40-Antikörper resuspendiert (4×10^6 Zellen/ml) und 100µl Suspension (4×10^5 Zellen/Napf) in 96er Flachboden Platten (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert. Nach 4 Tagen Inkubation (37 °C) wurden die Überstände in 96er Flachbodenplatten überführt und bei -80 °C eingefroren.

2.10 Histologie

Die Präparation des perfundierten Gewebes und die immunhistochemische Färbungen der Präparate (auf CD3, B220, MAC-3, APP, GFAP sowie LFB-PAS) wurden vom technischen Personal des Instituts für Neuropathologie durchgeführt.

2.10.1 Perfusion von Mäusen

Für histologische Untersuchungen wurden die Mäuse mit Ketamin (100 mg/kg) und Rompun (5 mg/kg) narkotisiert, der Thorax geöffnet und anschließend das Herz freipräpariert. In den linken Vorhof wurde eine Kanüle eingeführt und mit einer Schere der rechte Vorhof geöffnet. Über die Kanüle wurden dann ca. 50 ml PBS und anschließend 4 % PFA (2.1) in PBS langsam in das Herz gepumpt. Das PFA verteilte sich gleichmäßig Blutkreislauf und führte zu einer Fixierung des Gewebes. Die Wirbelsäule

2.12 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für die Messung der Antigen-abhängigen IL-17, IFN- γ und IL-10 Produktion durch Lymphozyten wurden die Überstände 1:3 mit PBS verdünnt und die Zytokinkonzentrationen mittels DuoSet ELISA Kits (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers ermittelt. Für die Messung der LPS-abhängigen CCL2, CCL5, CXCL1 und CXCL2 Produktion durch peritoneale Makrophagen wurden die Überstände 1:20 in PBS verdünnt und die Konzentrationen ebenfalls mit DuoSet ELISA Kits (R&D Systems) bestimmt. Die Messung der IFN- α und IFN- β Konzentration aus Hirnhomogenaten erfolgte durch Maus IFN ELISA Kits (PBL Biomedical Laboratories) nach Anleitung des Herstellers.

Die Quantifizierung IL-17, IFN- γ und IL-4 produzierender Lymphozyten mittels ELISPOT wurde in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Ilona Gutcher am Institut für Neuroimmunologie des Universitätsspitals Zürich durchgeführt.

2.13 Genexpressionsanalysen

2.13.1 Isolierung und Aufreinigung von RNA

Die in der vorliegenden Arbeit für die Genexpressionsanalyse untersuchten Gewebe (Rückenmark) wurden isoliert, mit PBS gespült und für mindestens 24 h in 0,5 ml RNAlater (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufbewahrt. Das Gewebe wurde dann in RLT Puffer (1 % β -Mercaptoethanol; 2.1) überführt (9 μ l Puffer auf 1mg Gewebe) und mit einem elektrischen Homogenisator (Ultra Turrax[®], IKA[®], T18 Basic, works do Brasil Ltda) homogenisiert. Zur Entfernung von RNAsen wurde der Homogenisator vor jeder Homogenisierung mit 0,1 % Triton X-100 (2.1) in 70 % Ethanol gereinigt. Es folgte eine Spülung mit 100 % reinem Ethanol (2.1) und RNase freien, demineralisierten Wasser. Das Homogenat wurde dann mittels Qiashredder (2.4) weiter aufgeschlossen und im Verhältnis 1:2 in 70 % RNase freiem 70 %igen Ethanol aufgenommen. Die RNA-Extraktion und Aufreinigung erfolgte mit dem RNeasy[®] Mini Kit (2.4) nach Anleitung des Herstellers. Die RNA wurde mit 30 μ l RNase- freiem Wasser eluiert.

Es folgte schließlich eine spektrophotometrische Analyse zur Bestimmung der Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der RNA (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg). Dabei wurde der Absorptionskoeffizient der RNA bestimmt, welcher sich aus dem Verhältnis A₂₆₀ zu A₂₈₀ ergibt und zwischen 1,6 und 2,0 liegen sollte.

Niedrigere Werte lassen auf Verunreinigungen durch Proteine und Salze schließen. Das Eluat wurde bei -80 °C gelagert.

2.13.2 Reverse Transkription

Zunächst wurden Spuren chromosomaler DNA aus dem RNA-Eluat enzymatisch verdaut. Dazu wurde 1 µg RNA zusammen mit 1 µl (10 U/µl) DNase I (2.5.1), 1 µl (40 U/µl) RNase-Inhibitor (2.5.1) und 1,4 µl 10x DNase Puffer in einem Volumen von 14 µl auf einem Heizblock inkubiert (Eppendorf comfort; 30 min, 37 °C) und die Enzyme anschließend für 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Für die reverse Transkription wurden auf den 14 µl RNA- Ansatz 8 µl 5 x RT-Puffer, 8 µl DTT (0,1 M) und 2 µl (200 U/µl) Reverse Transkriptase (2.5.1) sowie 4 µl (55 µm/ml) Oligo p(dT)₁₅ Primer (Roche Diagnostics GmbH) und 4 µl dNTP (Peqlab, Erlangen, Deutschland) gegeben und für 1 h bei 37 °C umgeschrieben. Die Reaktion wurde dann durch Hitzeinaktivierung (15 min, 70 °C) beendet und weitere 30 µl ddH₂O dazugegeben. Die cDNA konnte so für Wochen bis Monate bei -20 °C gelagert werden.

2.13.3 Quantitative PCR

Die Genexpression im Rückenmark während der EAE wurde mittels Realtime-PCR bestimmt. Dabei kann durch den Einbau des Fluoreszenzfarbstoffes Sybr[®] green (2.5.1) in das Amplifikat durch Messung der Fluoreszenz eine Kinetik der PCR erstellt werden. Die Gerätesoftware (iCycler, Bio-rad, München, Deutschland), erstellt eine Reaktionskurve aus der Fluoreszenz- und Zykluszahl für jeden Reaktionsansatz. Durch einen von der Software vorgeschlagenen Schwellenwert der Fluoreszenz ergibt sich für jeden Reaktionsansatz einen Zahlenwert (ct-Wert), welcher die Zykluszahl bei Erreichen des Schwellenwerts angibt. Je später dieser Wert in einer Reaktion erreicht wird, desto niedriger war die Konzentration der cDNA des entsprechenden Gens zu Beginn der Reaktion.

Die Genexpression wurde in dieser Arbeit nach der Pfaffl-Methode berechnet (Pfaffl et al., 2001). Dazu wurden für jedes Gen eine Primereffizienz bestimmt. Zur Bestimmung der Primereffizienz wurden zunächst Verdünnungsreihen (1:2) von cDNA-Proben erstellt und die entsprechenden PCR bei verschiedenen, definierten Verdünnungen durchgeführt. Die aus diesen Reaktionen gewonnenen ct-Werte wurden gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Mengen aufgetragen und es wurde anschließend eine extrapolierte Gerade erstellt. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich die Effizienz der Amplifikation.

Standard realtime PCR Reaktionsansatz:

2,5 µl (14 µg/ml) cDNA

0,1 µl 50 µM Forward Primer

0,1 µl 50 µM Reverse Primer

9,8 µl ddH₂O

12,5 µl SYBR® Green Fluorescein Mix (2.5.1)

Tab. 2.5: Sequenzen und Namen der verwendeten Oligonukleotide

| Oligoneucleotid | | Sequenz | Annealing T (C) |
|-----------------|-----|----------------------------------|-----------------|
| GAPDH | for | 5'- TCCTGCACCACCAACTGCTTAGCC -3' | 58 |
| | rev | 5'- GTTCAGCTCTGGGATGACCTTGCC -3' | |
| CCL2 | for | 5'- TCTGGGCCTGCTGTTACCC -3' | 63,8 |
| | rev | 5'- TTGGGATCATCTTGCTGGTG -3' | |
| CCL3 | for | 5'- CACCACTGCCCTTGCTGTT -3' | 63,8 |
| | rev | 5'- AGGAGAAGCAGCAGGCAGTC -3' | |
| CCL5 | for | 5'- TGCCCACGTCAAGGAGTATTT -3' | 63,8 |
| | rev | 5'- TCTCTGGGTTGGCACACTT -3' | |
| CCL12 | for | 5'- GCTACCACCATCAGTCCTCAGG -3' | 63,8 |
| | rev | 5'- CTTCCGGACGTGAATCTTCTG -3' | |
| CXCL10 | for | 5'- TGCTGGGTCTGAGTGGGACT -3' | 63,8 |
| | rev | 5'- CCCTATGGCCCTCATTCTCAC -3' | |
| IFN-γ | for | R&D Systems, | 58 |
| | rev | Wiesbaden, Deutschland | |
| TNF-α | for | 5'- CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3' | 58 |
| | rev | 5'- TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3' | |
| IL-13 | for | 5'- AGGCCAGCCCACAGTTCTACAGT -3' | 58 |
| | rev | 5'- CCAGCGGCCAGGTCCACAC -3' | |
| TGF-β1 | for | 5'- GGAAGCAGTGCCCGAACC -3' | 60 |
| | rev | 5'- AGCCAAGTCCGTACAACCTCCA -3' | |
| IL-23p19 | for | 5'- CTGTTGCCCTGGGTCACTCA -3' | 58 |
| | rev | 5'- CACACTGGATACGGGGCACATTA -3' | |
| IL-6 | for | 5'- CCGGAGAGGAGACTTCACAG -3' | 58 |
| | rev | 5'- GGTAGCATCCATCATTCTTTG -3' | |
| STAT6 | for | 5'- CTACGGCATCTCCTGGCTGACTG -3' | 58 |
| | rev | 5'- GCTGTTTCCCTTCCCCTGCTCT -3' | |
| IL-12p35 | for | 5'- GCCACCCTTGCCCTCCTAA -3' | 58 |
| | rev | 5'- GGTTTGGTCCCGTGTGATGTC -3' | |
| IFN-U745 | for | 5'-CAGGCCACTCTGCATTTCTC-3' | 58 |
| IFNfloxRT | rev | 5'-TCAATACTGCGGGGAGGCTTGAGTG-3' | |

2.14 Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) können Zellpopulationen in flüssigem Medium durch Messung von Streulicht und Fluoreszenzen charakterisiert und unterschieden werden. Letztere werden durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper hervorgerufen, welche spezifische Antigene auf Zellen binden. Das Prinzip der Durchflußzytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn sie einen Laserstrahl passiert. Das dabei emittierte Streulicht wird von verschiedenen Spiegeln und Filtern reflektiert und über Detektoren registriert. Das durch Beugung hervorgerufene Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) dient dabei als Maß für die Zellgröße, und das durch Brechung hervorgerufene Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) dient als Maß für die Granularität einer Zelle.

2.14.1 Markierung von Oberflächenantigenen

Die zu untersuchenden Zellen wurden in FACS™ Röhren (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit FACS-Puffer gewaschen, in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit ca. 1 µg Antikörper/1 x 10⁶ Zellen für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (Eppendorf 5810 R, 10 min, 1000rpm) und im Falle einer Analyse von Blut oder Splenozyten in 1 ml BD FACS™ Lysing Solution (2.1) resuspendiert und für 5 min inkubiert, um Erythrozyten in den Suspensionen zu lysieren. Die Lyse wurde durch Zugabe von ca. 2 ml FACS-Puffer gestoppt und die Zellen zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in ca. 0,4 ml FACS-Puffer aufgenommen und lichtgeschützt bei 4 °C bis zur Messung gelagert.

FACS-Puffer: in PBS: 2 % FCS
0.01M EDTA pH 8.0
0.1 % NaN₃

2.14.2 Messung und Auswertung der Zellpopulationen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden mit dem FACSCalibur® Zytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Wurden pro Ansatz mehr als ein Marker verwendet, so wurden unmarkierte und einfachmarkierte Kontrollen einbezogen, da die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe überlappende Emissionsspektren haben und diese bei der Messung kompensiert werden mussten. Die Auswertung der Messung erfolgte mit der WinMDI 2.8 Software (Scripps-research Institut, USA).

Tab. 2.6: Antikörper für durchflußzytometrische Analysen

| Antikörper/Fluorochrom | Klon | Isotyp | Hersteller |
|------------------------|-----------|------------------------------------------|-------------------------------------|
| MHCII-PE | AF6-120.1 | Mouse (BALB/c) IgG _{2a,κ} | BD Pharmingen, Heidelberg, D |
| CD45-PerCP | 30-F11 | Ratte (LOU/Ws1/M) IgG _{2b,κ} | BD Pharmingen |
| CD11b-APC | M1/70 | Ratte (DA) IgG _{2b,κ} | Natutec, Frankfurt am Main, D |
| CD3-PE | 145-2C11 | Arm. Hamster IgG1, κ | BD Pharmingen |
| CD4-PE | RM4-5 | Ratte (DA) IgG _{2a,κ} | Natutec |
| Gr1-FITC | RB6-8C5 | Ratte IgG _{2b,κ} | BD Pharmingen |
| Ly6C-Biotin | AL-21 | Ratte IgM, κ | Natutec |
| CD45R (B220)-FITC | RA3-6B2 | Ratte IgG _{2a,κ} | BD Pharmingen |
| CD62L-FITC | MEL-14 | Ratte (Fischer) IgG _{2a,κ} | BD Pharmingen |
| CD44-PE | IM7 | Ratte IgG _{2b,κ} | BD Pharmingen |
| IFNAR-Biotin | MAR1-5A3 | Maus IgG1 | Robert Schreiber, St. Louis, USA |

Tab. 2.7: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome

| Fluorochrom | Absorbtiionsmax. | Emissionsmax. | Anregungswellenlänge |
|-------------|------------------|---------------|-----------------------|
| (R)-PE | 480, 565 nm | 578 nm | 488, 532 nm |
| FITC | 495 nm | 519 nm | 488 nm |
| APC | 650 nm | 660 nm | 595, 633, 635, 647 nm |
| PerCP | 482 nm | 678 nm | 488, 532 nm |

3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

Obwohl seit vielen Jahren bei multipler Sklerose IFN- β als Medikament zum Einsatz kommt und zu einer Verbesserung der klinischen Symptome führt (Rudick, 1999), ist bis heute der genaue Wirkungsmechanismus unklar. Zur Klärung der Funktion und Wirkung der Typ 1 Interferone wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Studien am Tiermodell der MS, der EAE, durchgeführt, welche jedoch zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führten. In einigen Studien blieb eine Therapie durch exogenes IFN- β wirkungslos (Luca et al., 1999), andere Arbeiten zeigten therapeutische Effekte nur durch kombinierte Gabe weiterer Substanzen wie Vitamin B12 (Mastronardi et al., 2004; Runström et al., 2006). Während nur wenige Studien durch alleinige Gabe von exogenem IFN- β eine Verbesserung der EAE Symptome demonstrierten (Floris et al., 2002; Martin-Saavendra et al., 2007), wiesen neuere Arbeiten auf eine neuartige Funktion der endogenen Typ 1 Interferone hin, welche durch die Applikation verschiedener Liganden wie Poly I:C oder MOG₉₁₋₁₀₈ DNA induziert wurden (Wefer et al., 2004; Touil et al., 2006). Darüberhinaus zeigten Experimente an IFN- β defizienten Mäusen, dass endogenes, krankheitsassoziiertes IFN- β einen schützenden Effekt für den Verlauf der EAE hat (Teige et al. 2003; Rundström et al., 2006). Allerdings konnten keine der Studien molekulare Mechanismen hinter den therapeutischen Effekten identifizieren oder die Frage beantworten, auf welche Gewebe bzw. Zelltypen die Typ 1 Interferone ihre immunmodulatorische Wirkung ausübten.

Das Ziel der Arbeit war deshalb, neue Erkenntnisse über die Wirkung von endogenem Typ 1 IFN, insbesondere des Typ 1 IFN Rezeptors während der EAE zu gewinnen. Dazu sollte überprüft werden, ob in dem verwendeten Tiermodell, der MOG₃₅₋₅₅ induzierten EAE in C57BL/6 Mäusen, eine Produktion von Typ 1 Interferonen sowie die Expression von Typ 1 IFN-abhängigen Genen stattfindet. Zur Klärung der Funktion dieser krankheitsassoziierten Typ 1 IFN sollten außerdem Experimente an IFNAR defizienten Mäusen durchgeführt werden. Aufgrund der ubiquitären Expression des IFNAR bestand ein weiteres Ziel darin, durch Experimente an gewebe- und zellspezifischen IFNAR-defizienten Mäusen den entscheidenden Gewebe- oder Zelltyp zu identifizieren, über welchen die endogenen Typ 1 IFN ihre immunmodulatorische Wirkung ausüben. Ferner sollten die konditionalen, IFNAR-defizienten Mäuse, welche mit dem Cre-loxP-System hergestellt wurden, auf dessen Deletionseffizienz durch Charakterisierung der verschiedenen Mauslinien überprüft werden.

3.1 Endogene, krankheitsassoziierte Typ 1 IFN Produktion

3.1.1 Krankheitsassoziierte IFN- β Produktion im ZNS

Zur Überprüfung einer endogenen, krankheitsassoziierten Typ 1 IFN Produktion wurden C57BL/6 Mäuse immunisiert und in der akuten Phase der EAE (Tag 18) Rückenmark und Serum entnommen. Immunisierte, nicht erkrankte Tiere dienten als Kontrolle. Aus dem Rückenmark wurden ZNS-Homogenate hergestellt und die IFN- α und IFN- β Konzentrationen aus Serum und Rückenmark bestimmt.

Wie in Abbildung 3.1 ersichtlich, wurden im ZNS von erkrankten Tieren im Vergleich zu nicht erkrankten Tieren deutlich höhere Konzentrationen von IFN- β (141 pg/ml) gemessen, während im Serum kein IFN- β detektierbar war. IFN- α war weder im Serum noch Rückenmark nachweisbar (nicht gezeigt).

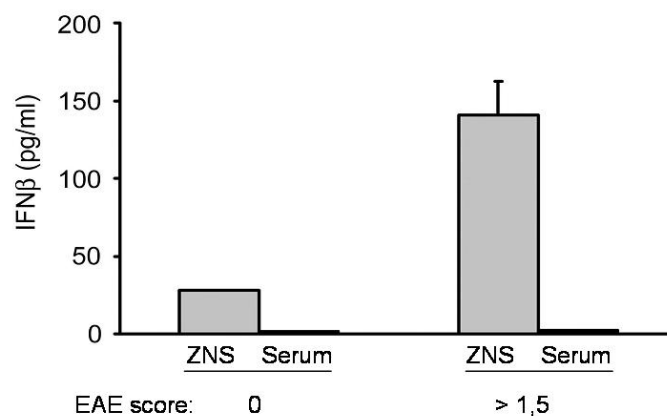


Abb. 3.1: Die EAE führt zu einer lokalen IFN- β Produktion im ZNS. Die IFN- β Konzentration im Serum (schwarze Balken) und ZNS (graue Balken) von immunisierten, nicht erkrankten (Score 0) und EAE erkrankten (Score > 1,5) Mäusen wurden mittels ELISA bestimmt.

3.1.2 Expression Typ 1 IFN-abhängiger Gene im ZNS

Um die Frage zu klären, ob die unter 3.1.1 beschriebene IFN- β Produktion zu einer Induktion IFNAR-abhängiger Gene führt, wurde RNA aus dem Rückenmark von gesunden sowie erkrankten Mäusen entnommen und im Northern Blot die Expression verschiedener Typ 1 IFN induzierbarer Gene analysiert. Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, kommt es im Gewebe der erkrankten Mäuse zu einer deutlichen Expression der Typ 1 IFN-abhängigen Gene IRF7, ISG15 und 2'5'OAS (Spuren 4 bis 8), wohingegen

im Gewebe immunisierter, nicht erkrankter Tiere keine Banden zu sehen sind (Spuren 1 bis 3). Die gleichmäßige Bandenstärke des *Housekeeping* Gens GAPDH und die Ethidiumbromid angefärbten 28S und 18S Untereinheiten belegen eine Auftragung gleicher RNA Mengen.

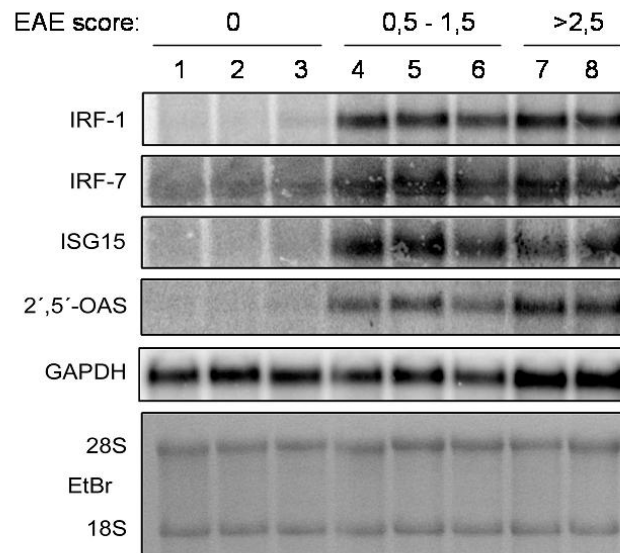


Abb. 3.2: Die EAE führt zu einer Induktion Typ 1 IFN-abhängiger Gene im ZNS. Northern Blot: RNA Proben aus dem ZNS immunisierter, nicht erkrankter Mäuse (Spalte 1-3), schwach erkrankter Mäuse (Spalten 4-6, Score 0,5-1,5) und schwer erkrankter Mäuse (Spalten 7 und 8, Score > 2,5). GAPDH, 28S und 18S Banden dienten als Beladungskontrollen. *Interferon regulatory factor* (IRF), 2'5' Oligoadenylatcyclase (2'5'OAS), *interferon stimulated gene* (ISG).

3.2 Die Funktion des IFNAR während der EAE

3.2.1 Klinischer Verlauf der EAE in IFNAR^{-/-} Mäusen

Zur Klärung des Einflusses der in 3.1 beschriebenen, endogenen Typ 1 IFN Produktion auf die EAE wurden WT (Wildtyp) und IFNAR^{-/-} Mäuse immunisiert und über einen Zeitraum von 35 Tagen beobachtet. Abb. 3.3 zeigt einen signifikant schwereren Verlauf der EAE in IFNAR^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Tieren. In beiden Gruppen setzten die klinischen Symptome an Tag 13 bis 14 ein und verschlechterten sich in den folgenden Tagen sukzessiv. Der klinische Verlauf der WT Mäuse erreichte einen Höhepunkt an den Tagen 16 bis 18 (EAE Score $2,5 \pm 0,3$) und ging dann in eine remittierende Phase über, während die IFNAR^{-/-} Mäuse eine chronische Verlaufsform entwickelten, die an den Tagen 17 bis 19 ihren Höhepunkt erreichte (EAE Score $2,9 \pm 0,3$). Im Gegensatz zu den WT Tieren verblieben die klinischen Symptome der IFNAR^{-/-} Mäuse für den

restlichen Verlauf des Experiments auf hohem Niveau und gingen nicht in Remission. Das Fehlen des IFNAR führte außerdem zu einer Letalität von 30% und einem signifikant erhöhtem, mittleren maximalen EAE Score (siehe Tab. 3.1)

Die Ergebnisse zeigen, dass die unter 3.1 beschriebene IFN- β Produktion und die Induktion Typ 1 IFN-abhängiger Gene im ZNS eine schützende Funktion auf den Verlauf der EAE ausüben.

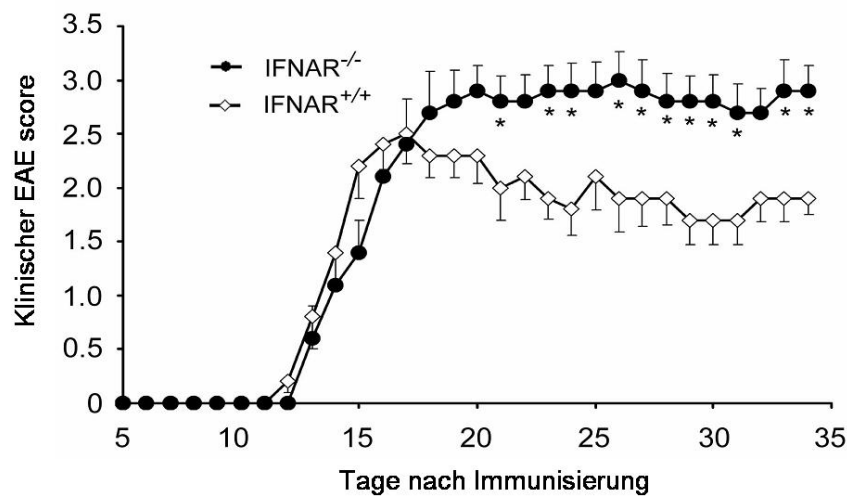


Abb. 3.3: Klinischer Verlauf einer EAE in IFNAR^{-/-} (schwarze Kreise) und WT (weiße Kreise) Mäusen im Vergleich. Gezeigt ist hier eines von drei unabhängigen Experimenten mit gleichem Verlauf. Tage mit statistisch signifikant unterschiedlichen EAE Scores sind mit Stern markiert (* p<0,05).

Tab. 3.1: Statistische Auswertung und Vergleich der klinischen Verläufe von WT und IFNAR^{-/-} Mäusen aus Abb. 3.3

| Maus Genotyp | Inzidenz (%) | Letalität (%) | Tag der ersten Sympt. (± SEM) | max. EAE Score (± SEM) |
|----------------------|--------------|---------------|-------------------------------|------------------------|
| IFNAR ^{-/-} | 10/10 (100) | 30* | 13.4 ± 0.5 | 3.4 ± 0.1* |
| IFNAR ^{+/+} | 10/10 (100) | 0 | 14.1 ± 1.1 | 2.4 ± 0.3 |

3.2.2 Vergleichende, histopathologische Analysen zwischen WT und IFNAR^{-/-}

Im Rahmen einer histopathologischen Analyse wurden die infiltrierenden Zellen und die Demyelinisierung der weißen Substanz im Rückenmark an Tag 35 (chronische Phase der EAE) quantifiziert. Übersichtsaufnahmen lassen eine deutlich erhöhte Zahl von infiltrierenden Makrophagen und Mikroglia (MAC-3) sowie eine höhere Demyelinisierung (LFB) im Rückenmark der IFNAR^{-/-} Tiere erkennen (Abb. 3.4 A). Eine quantitative Analyse bestätigte eine signifikant erhöhte Zahl von infiltrierenden Makrophagen und Mikroglia (145 Zellen/mm² ± 16) in IFNAR^{-/-} im Vergleich zu WT Tieren (79 Zellen/mm² ± 20; Abb. 3.4 B rechts), sowie eine höhere Demyelinisierung in IFNAR^{-/-} (14,0% ± 2,4) im Vergleich zu WT (7,9% ± 2,2; Abb. 3.4 B links). Die Zahl der infiltrierenden T-Zellen hingegen war in WT (71 Zellen/mm² ± 23) und IFNAR^{-/-} (84 Zellen/mm² ± 14) Tieren nicht signifikant verändert (Abb. 3.4B rechts).

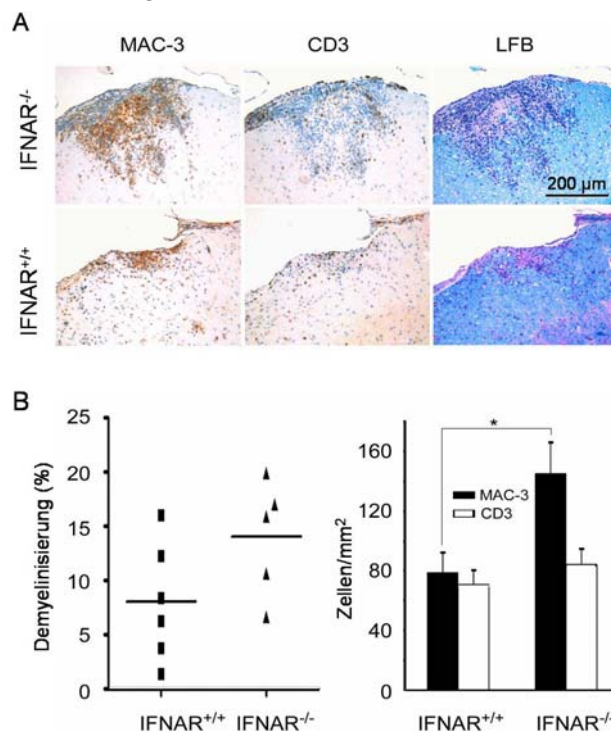


Abb. 3.4: Erhöhte Infiltration von Makrophagen und gesteigerte Demyelinisierung des ZNS von IFNAR^{-/-} Mäusen. A) Übersichtsaufnahmen und B) vergleichende, quantitative Analyse der Mikroglia/infiltrierenden Makrophagen (MAC-3) und T-Zellen (CD3) sowie der Demyelinisierung (*Luxol fast blue*, LFB) der weißen Substanz des Rückenmarks (* p < 0,05).

3.2.3 T-Zell Zytokinprofil in der Peripherie und im ZNS

Da die EAE eine CD4⁺ T-Zell vermittelte Erkrankung ist, bei der das Th1/Th17 Verhältnis den Verlauf der Erkrankung bestimmt, wurde untersucht, ob es einen

Zusammenhang zwischen der Th-Zelldifferenzierung und dem IFNAR gibt. Dazu wurden ELISPOT Experimente an Lymphozyten und ZNS-infiltrierenden Zellen aus immunisierten WT und IFNAR^{-/-} Mäusen durchgeführt und die Antigen-abhängige Produktion der für Th1-, Th2- und Th17-Zellen charakteristischen Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-17 bestimmt.

Die Werte in der Abb. 3.5 verdeutlichen, dass an den Tagen 7 und 14 die Zahl IL-17 produzierender Lymphozyten (Th17-Zellen) deutlich höher war als die der IFN- γ produzierenden Zellen (Th1-Zellen). Hingegen war das Verhältnis der Th1 und Th17-Zellen am 14. Tag im ZNS ausgeglichen. Das Zytokinprofil ZNS-infiltrierender Zellen am 7. Tag konnte aufgrund der niedrigen Gesamtzellzahl nicht bestimmt werden. Der direkte Vergleich zwischen WT und IFNAR^{-/-} zeigte, dass das Fehlen des IFNAR keinen Einfluss auf das Verhältnis und die Gesamtzahl der Th1- und Th17-Zellen hatte. Da in einigen Arbeiten angenommen wurde, dass Typ 1 IFN eine Verschiebung des Th1/Th2 Zytokinmilieus zugunsten von Th2 induzieren und so die Effektorfunktionen der Th1-Zellen herunterregulieren (Wang et al., 2000; Tuohy et al., 2000), wurde die Zahl IL-4 produzierender Zellen (Th2 Zellen) in WT und IFNAR^{-/-} bestimmt. Auch hier konnten in beiden Gruppen keine nennenswerte Zahl von Th2 Zellen nachgewiesen werden. Das Fehlen des IFNAR führt also nicht zu einer Veränderung des Th1/Th2 Verhältnisses.

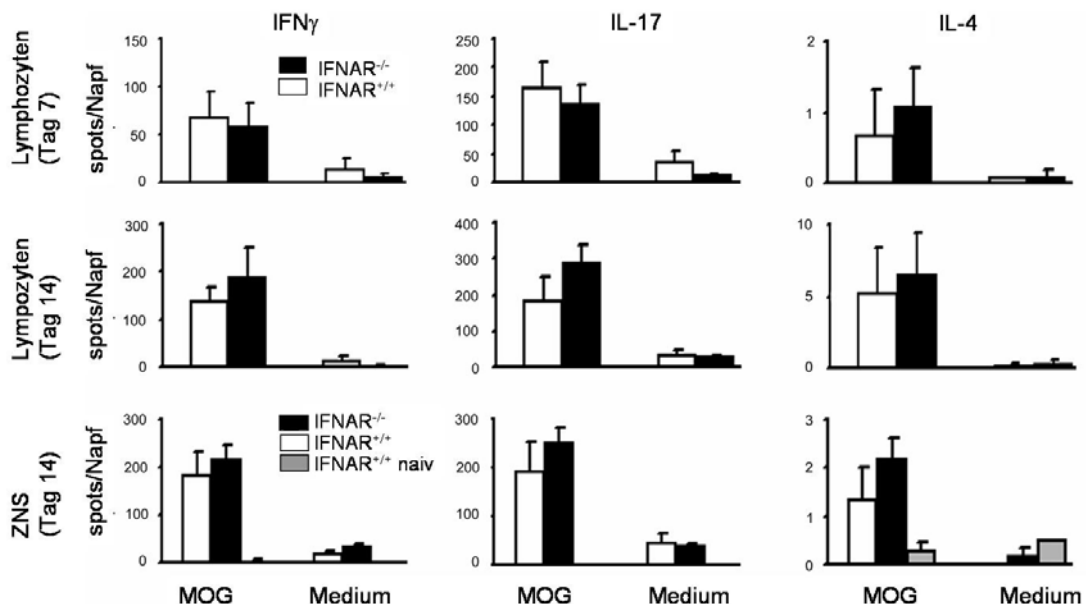


Abb. 3.5: Quantifizierung von IFN- γ , IL-4 und IL-17 produzierenden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten aus Lymphknoten und ZNS. Enzyme-linked immunospot Analyse (ELISPOT) des Antigen-abhängigen Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4) und Th17 (IL-17) Profils von Lymphozyten und ZNS-infiltrierenden Zellen.

3.2.4 Vergleichende Genexpressionen im ZNS

Da die Bindung von Typ 1 IFN an den IFNAR zu einer Induktion von zahlreichen Genen führt (Platanias 2005) und durch das Fehlen des IFNAR möglicherweise die Expression krankheitsrelevanter Gene verändert, wurde eine vergleichende Expressionsanalyse von Chemokinen und Zytokinen zwischen WT und IFNAR^{-/-} Tieren durchgeführt. Dabei wurden Zytokine untersucht, welche insbesondere die Th Zelldifferenzierung steuern. Bei den Chemokinen wurde auf für Makrophagen und aktivierte T-Zellen chemotaktisch wirkende Proteine fokussiert. Die Expression der Chemokine wurde in der akuten Phase der EAE (Tag 18) analysiert. Für die Th1, Th2 und Th17 Genexpression wurden als zusätzliche Zeitpunkte die präklinische Phase (Tag 10) und chronische Phase (Tag 30) hinzugezogen, da die Effektorfunktion der Th1 und Th17-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich stark ausgeprägt sind (Thakker et al., 2007; Komiyama et al., 2006).

Wie in Abb. 3.6 A zu sehen, stieg die Genexpression aller untersuchten Chemokine in der akuten Phase der EAE deutlich an. Während CCL5 (RANTES), CCL12 (MCP-5) und CCL3 (MIP-1 α) in WT und IFNAR^{-/-} in der EAE nicht unterschiedlich reguliert war, erhöhten sich in IFNAR^{-/-} CCL2 (MCP-1; 210fache Erhöhung) und CXCL10 (IP10; 259fache Erhöhung) signifikant gegenüber WT (CCL2: 44fache Erhöhung, CXCL10: 57fache Erhöhung).

Die Expression der Th1 Gene IFN- γ (über 100fache Erhöhung) und IL-12p35 (über 10fache Erhöhung) stieg in WT und IFNAR^{-/-} in der akuten und chronischen Phase der EAE deutlich an (Abb. 3.6 B links), während von den Th2 Genen nur IL-13 (10fache Erhöhung) in der chronischen Phase anstieg und STAT6 zu keinem Zeitpunkt der EAE reguliert wurde (Abb. 3.6 B Mitte). Von den Th17 Genen erhöhte sich lediglich IL-6 in der akuten Phase (über 10fach) und chronischen Phase (über 100fach), während die Expression von TGF- β 1 und IL-23 nur leicht erhöht war (unter 10fach; Abb. 3.6 B rechts).

Im direkten Vergleich zwischen WT und IFNAR^{-/-} war das Expressionsprofil der Th1, Th2 und Th17 Zytokine nicht signifikant verändert.

Die Ergebnisse belegen, dass durch das Fehlen des IFNAR in der EAE die Expression von CCL2 und CXCL10 selektiv hochreguliert ist, während die Regulation anderer Chemokine (CCL3, CCL5, CCL12) und die für die Th-Zelldifferenzierung wichtigen Zytokine nicht vom IFNAR abhängen.

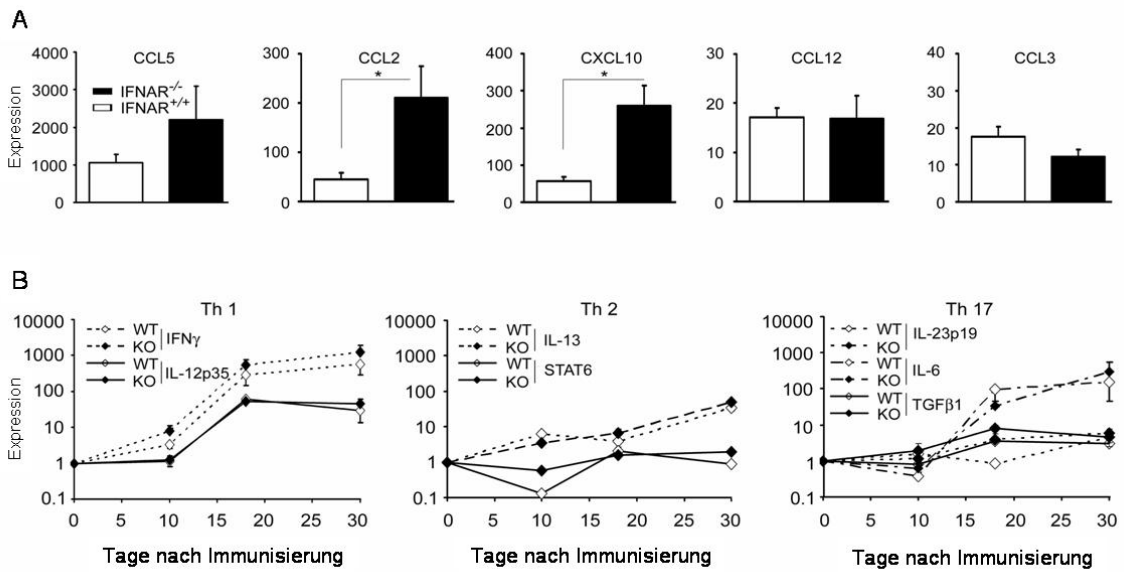


Abb. 3.6: Regulation krankheitsrelevanter Gene im ZNS. (A) Realtime PCR im Rückenmark von Chemokinen in der akuten Phase der Erkrankung und (B) Th1, Th2 und Th17 Zytokinen zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 10, 18 und 30) der EAE. Die Messwerte wurden mit der Expression von GAPDH normalisiert und mit der Genexpression aus gesunden WT Proben verglichen. *CC motif chemokine ligand* (CCL), *Cx motif chemokine ligand* (CXCL), Interleukin (IL), Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT), *transforming growth factor* (TGF) T_H Helfer (Th).

3.2.5 Adoptiver Transfer von MOG-spezifischen T-Zellen

Es bestand die Möglichkeit, dass die im kompletten Freundschens Adjuvans enthaltenen, hitzeinaktivierten *M. tuberculosis* Bakterien über *Toll-Like* Rezeptoren direkt Typ 1 IFN induzieren und so das *priming* der T-Zellen und die Reifung der dendritischen Zellen beeinflussen könnten. Um diese durch Immunisierung bedingten Effekte zu umgehen, wurden MOG-spezifische, enzephalitogene T-Zellen aus immunisierten WT Mäusen entnommen, in der Zellkultur für 4 Tage mit dem MOG-Peptid restimuliert und in IFNAR^{-/-} Mäuse adoptiv transferiert.

Wie in Abb. 3.7 dargestellt, erkrankten die IFNAR^{-/-} Mäuse wieder deutlich schwerer als die WT Kontrollen. Die ersten EAE Symptome setzten bei den IFNAR^{-/-} Mäusen schon nach 11 Tagen ein und verschlechterten sich sukzessive bis zu einem Erreichen eines Plateau um Tag 20. Die Symptome blieben dann bis zum Ende des Experiments auf gleichbleibend hohem Niveau. Die WT hingegen entwickelten ihre ersten Symptome um Tag 24 und verschlechterten sich dann ebenfalls, wobei die Progression der Erkrankung deutlich verlangsamt war im Vergleich zu IFNAR^{-/-} (siehe auch Tab 3.2).

Die Induktion der EAE durch den adoptiven Transfer MOG-spezifischer Effektor T-Zellen zeigt, dass die Ursachen für die schwereren Symptome in den IFNAR^{-/-} Mäusen nicht in einem unterschiedlichen *priming* oder im Adjuvans begründet sind.

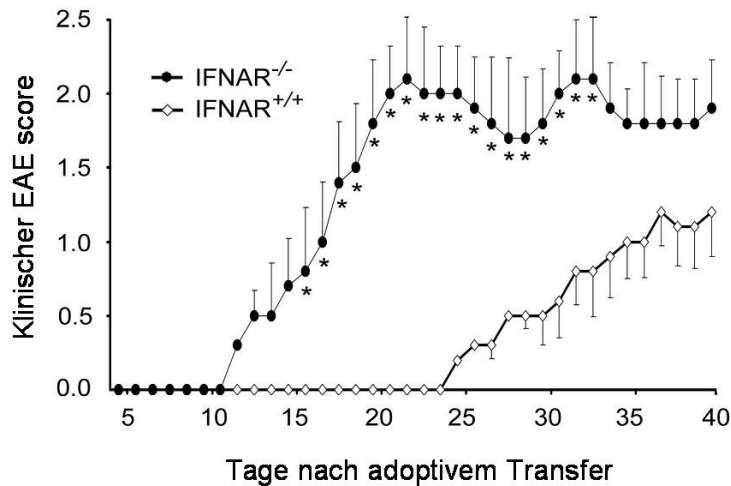


Abb. 3.7: Klinischer Verlauf einer EAE in IFNAR^{-/-} (schwarze Kreise) und WT (weiße Kreise) Mäusen nach adoptivem Transfer enzephalitogener WT T-Zellen. Gezeigt ist hier eines von drei unabhängigen Experimenten mit gleichem Ergebnis. Tage mit statistisch signifikant unterschiedlichen EAE Scores sind Stern markiert (* p<0,05).

Tab. 3.2: Statistische Auswertung und Vergleich der klinischen Verläufe von WT und IFNAR^{-/-} Mäusen nach adoptivem Transfer aus Abb. 3.7

| Maus Genotyp | Inzidenz (%) | Tag der ersten Sympt. (± SEM) | max. EAE Score (± SEM) | akkumul. EAE Score (± SEM) |
|----------------------|--------------|-------------------------------|------------------------|----------------------------|
| IFNAR ^{-/-} | 5/6 (83) | 18,0 ± 2,7* | 3,2 ± 0,3 | 44,2 ± 14,9 |
| IFNAR ^{+/+} | 4/6 (67) | 27,3 ± 1,9 | 2,5 ± 0,5 | 11,8 ± 5,1 |

3.3 Charakterisierung der spezifischen IFNAR Deletionen

Die in dieser Arbeit verwendeten, zellspezifischen IFNAR knockout Mauslinien wurden mit Hilfe des Cre-loxP Systems hergestellt (Gu et al., 1994). Dabei wurde das Exon 10 des IFNAR 1 mit LoxP Sequenzen in *trans* Position flankiert (Abb. 3.8 Mitte). Das Exon 10 codiert für den stark lipophilen Teil des Rezeptors, der die transmembrane Domäne des IFNAR 1 darstellt. Das Enzym Cre-Rekombinase erkennt die LoxP Sequenzen, schneidet die DNA zwischen den LoxP Sequenzen aus dem Genom heraus und fügt die Enden der beiden LoxP Sequenzen zusammen (Abb. 3.8 unten). Durch einen Promotor, welcher dem Cre-Rekombinase Gen vorgeschaltet ist, kann festgelegt werden, in welchem Gewebe oder Zelltyp das Enzym synthetisiert wird. Die in dieser Arbeit eingesetzten Mauslinien zur spezifischen Deletion des IFNAR im ZNS, T-Zellen, B-Zellen und myeloischen Zellen sind in Tab. 3.3 aufgeführt. Die Deletion des Exon 10 aus IFNAR 1 führte zu einem vollständigen Verlust der Funktion des gesamten IFNAR.

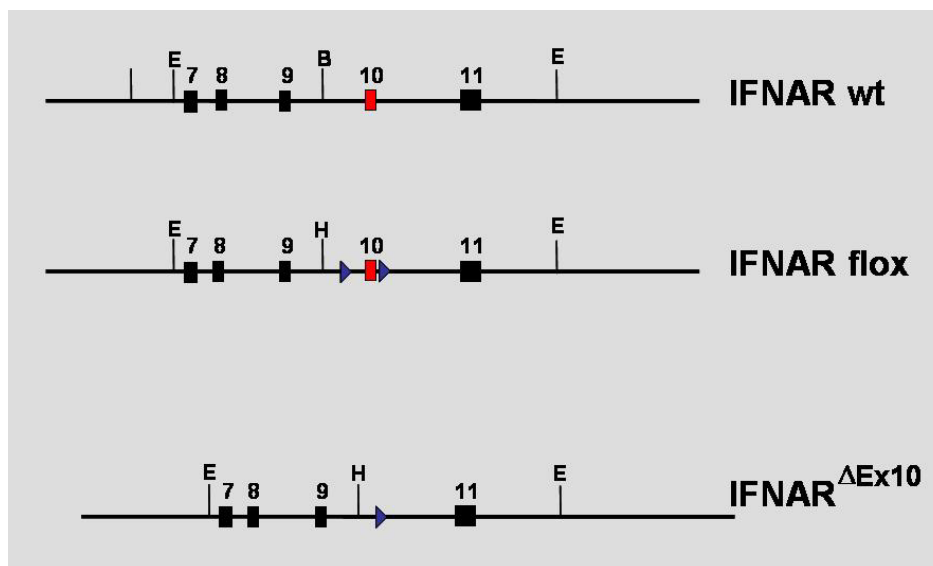


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der zellspezifischen IFNAR Deletion. Die blauen Dreiecke symbolisieren die LoxP Sequenzen. Die roten und schwarzen Quadrate stehen für die Exone des IFNAR 1, und die Buchstaben E, B und H für verschiedene Schnittstellen spezifischer Restriktionsendonukleasen. LoxP flankiertes Gen (flox), Deletion des Exon 10 (Δ Ex 10).

Tab. 3.3: Zellspezifität der in dieser Arbeit verwendeten Cre-Mauslinien

| Cre-Mauslinien | Aktivität | Quelle |
|----------------|------------------------------------------|----------------------|
| Nestin | Astrozyten, Neurone, Oligodendrozyten | Tronche et al., 1999 |
| CD4 | T-Zellen | Wolfer et al., 2001 |
| CD19 | B-Zellen | Rickert et al., 1997 |
| LysM | Myeloische Zellen | Clausen et al., 1999 |

3.3.1 Southern Blot Analyse der verschiedenen zellspezifischen Deletionen

Vor Beginn der EAE Experimente musste die Funktion des Cre-LoxP Systems überprüft werden. Dabei sollte sowohl die Spezifität der verschiedenen Cre-Mauslinien als auch die Effizienz getestet werden, mit der das Exon 10 in den entsprechenden Geweben deletiert wurde. Dazu wurde von allen Cre-Mauslinien, die auf IFNAR^{fl/fl} Hintergrund gezüchtet waren, chromosomale DNA aus verschiedenen Geweben und aufgereinigten Zelltypen entnommen und mittels Southern Blot analysiert.

In Abb. 3.9 A sind die Analysen der IFNAR^{fl/fl} NestinCre (ZNS spezifische Deletion des IFNAR) zu sehen. Hier zeigt sich eine deutliche Deletionsbande (4,1 kb) in der DNA aus ZNS Homogenaten, wohingegen in der Milz DNA ausschließlich eine WT Bande zu erkennen ist (5,0 kb). In den Cre-negativen Kontrollen sind ausschließlich WT Banden zu sehen. Die in der DNA aus ZNS Homogenaten schwach zu erkennende WT Bande ist möglicherweise auf Mikroglia zurückzuführen, welche hämatopoetischen Ursprungs sind und keine Nestinpromotoraktivität aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurden weitere Southern Blot Analysen an DNA aus isolierten Mikroglia und Astrozyten (IFNAR^{fl/fl} NestinCre) durchgeführt. Da Astrozyten neuroektodermalen Ursprungs sind und hier der Nestinpromotor aktiv ist, war in den Astrozyten eine Deletion zu erwarten. Abbildung 3.9 A (rechts) zeigt eine deutliche Deletionsbande in der Astrozyten-DNA und eine klare WT-Bande in der Mikroglia-DNA. Zusammenfassend zeigen die Analysen, dass in den IFNAR^{fl/fl} NestinCre Mäusen das Exon 10 des IFNAR 1 spezifisch im ZNS, mit Ausnahme der Mikroglia, deletiert ist.

Zur Überprüfung des Cre-LoxP Systems in den IFNAR^{fl/fl} CD4Cre Mäusen wurde chromosomale DNA aus dem T-Zell-reichen Thymus und aus der Milz entnommen. Hier war die Deletionsbande im Thymus deutlich und in der Milz nur schwach zu erkennen (Abb. 3.9 B). Die IFNAR^{fl/fl} Kontrollen zeigten deutliche WT-Banden und keine Deletionsbanden in beiden Geweben. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass in

IFNAR^{fl/fl} CD4Cre Mäusen das Exon 10 erwartungsgemäß selektiv im T-Zell-reichen Thymus, jedoch nur schwach in der Milz deletiert ist.

Im Falle der B-Zell spezifischen IFNAR^{-/-} (IFNAR^{fl/fl} CD19Cre) Mäuse waren die Deletionsbanden deutlich in der Milz, jedoch nicht im Thymus zu erkennen. Die DNA aus aufgereinigten B-Zellen zeigte ebenfalls eine starke Deletionsbande. Die IFNAR^{fl/fl} Kontroll DNA zeigte wieder eine distinkte WT Bande. Die Resultate belegen eine spezifische Deletion des Exon 10 in den B-Zellen.

In IFNAR^{fl/fl} LysMCre DNA aus ZNS, Milz, Leber, Niere und Lunge waren schwache Deletionsbanden zu sehen, welche wahrscheinlich auf residente Makrophagen und andere myeloische Zellen zurückzuführen sind. Die DNA von aufgereinigten CD11b⁺ Zellen aus der Milz hingegen zeigt eine starke Deletionsbande. Die Ergebnisse demonstrieren eine spezifische Deletion des Exon 10 in CD11b⁺ Makrophagen.

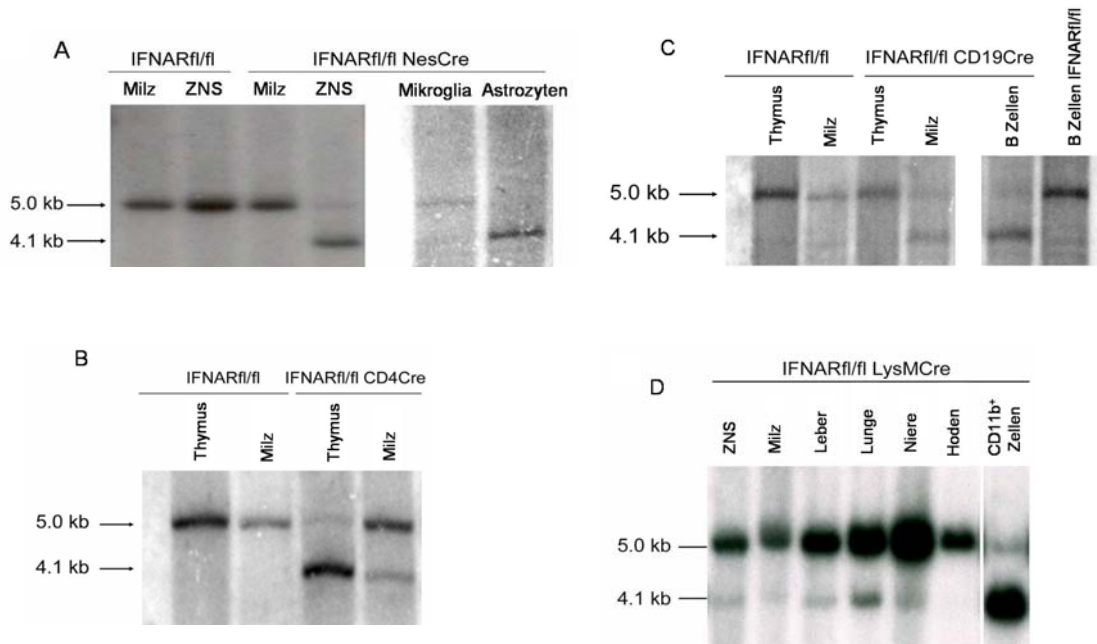


Abb. 3.9: Southern Blot Analysen der verschiedenen Cre-Mauslinien. Als Kontrolle wurden jeweils DNA Isolationen von Cre-negativen Geschwistern verwendet. A) DNA aus ZNS-spezifischen IFNAR knockout Mäusen (IFNAR^{fl/fl} NestinCre). B) DNA aus T-Zell-spezifischen IFNAR^{-/-} Mäusen (IFNAR^{fl/fl} CD4Cre). C) DNA aus B-Zell-spezifischen IFNAR^{-/-} Mäusen (IFNAR^{fl/fl} CD19Cre). D) DNA aus Makrophagen/Granulozyten-spezifischen IFNAR^{-/-} Mäusen (IFNAR^{fl/fl} LysMCre).

3.3.2 FACS-Analyse der zellspezifischen Deletionen

Die in 3.3.1 beschriebenen Southern Blot Analysen belegen eine spezifische Deletion des Exon 10 in den entsprechenden Geweben der verschiedenen Cre-Mauslinien. Um zu beweisen, dass diese Deletion zu einem vollständigen Verlust des IFNAR-Proteins auf der Zelloberfläche führt, wurde das Vorhandensein des IFNAR auf verschiedenen Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden von allen Cre-Mauslinien (mit Ausnahme von IFNAR^{fl/fl} NestinCre) Blut entnommen, um die Produktion von IFNAR auf Makrophagen, B- und T-Zellen zu untersuchen.

Wie in Abb. 3.10 zu sehen, wurde IFNAR konstitutiv auf Makrophagen, T und B-Zellen exprimiert (schwarze Linien). IFNAR^{-/-} Zellen wiederum exprimierten wie erwartet kein IFNAR (rote Linien). Die IFNAR^{fl/fl} CD4Cre Leukozyten exprimieren IFNAR auf B-Zellen und Makrophagen, jedoch nicht auf CD3⁺ T-Zellen (linke Spalte, grüne Linien). Entsprechend konnte eine selektive Deletion in B-Zellen der IFNAR^{fl/fl} CD19Cre Leukozyten beobachtet werden, die Expression des Rezeptors auf T-Zellen und Makrophagen hingegen entsprach der WT Situation (mittlere Spalte). Im Falle der IFNAR^{fl/fl} LysMCre Leukozyten zeigte sich eine normale Expression des IFNAR auf B und T-Zellen. Die CD11b⁺ Leukozyten hingegen waren zu über 50% IFNAR deletiert (linke Spalte).

Die Resultate verdeutlichen, dass die Deletion des Exon10 zu einem totalen Verlust des IFNAR auf der Zelloberfläche führte, und in allen T- und B-Zellen mit hoher Effizienz deletierte. In IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen hingegen waren nicht alle CD11b⁺ Zellen deletiert. Zu den CD11b⁺ Zellen im Blut gehören neben den Makrophagen auch Granulozyten und verschiedene Subpopulationen von dendritischen Zellen. Einige Zellen aus der Klasse der myeloischen Zellen scheinen also durch das LyMCre spezifische Cre-LoxP System nicht erfasst zu werden, was für die folgenden EAE Experimente zu berücksichtigen ist.

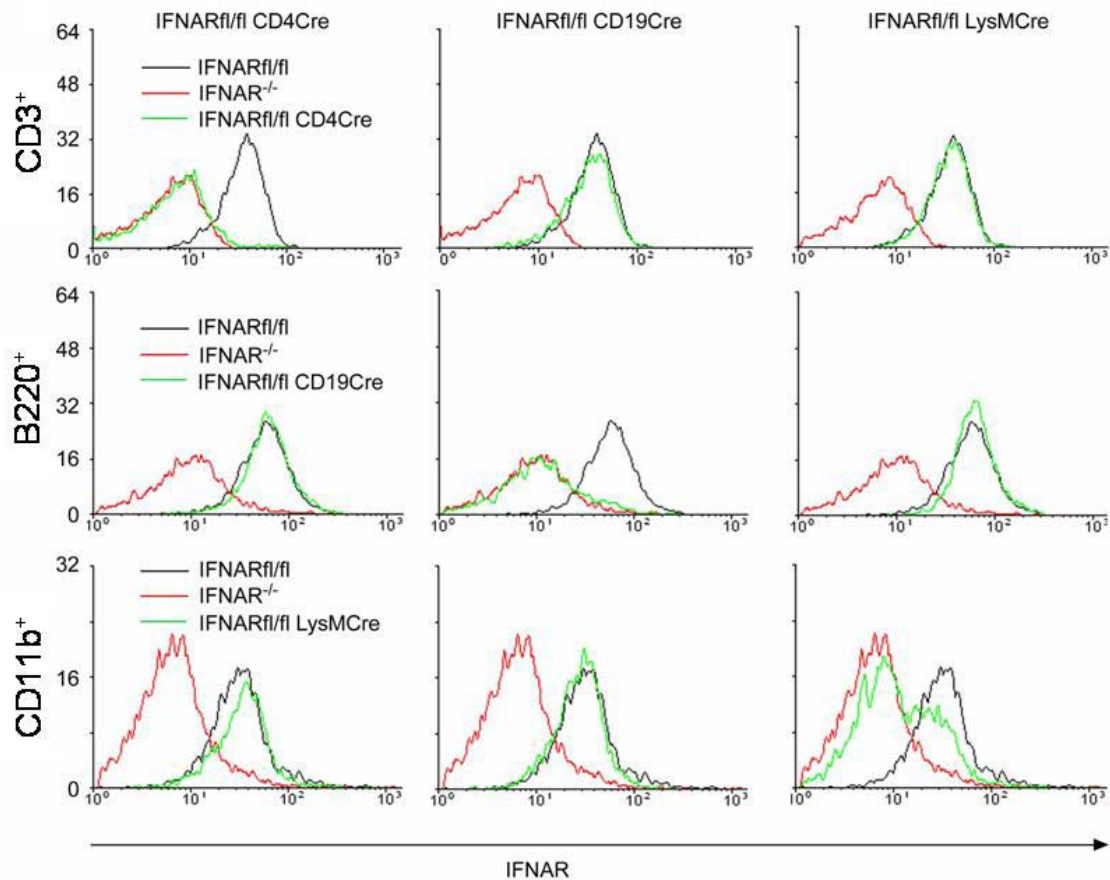


Abb. 3.10: Zellspezifische Deletion des IFNAR in konditionalen Cre-Mauslinien. Der Nachweis des Rezeptors erfolgte mittels FACS-Analyse auf Makrophagen, B und T-Zellen aus Blutleukozyten. Linke Spalte: IFNAR^{fl/fl} CD4Cre, mittlere Spalte: IFNAR^{fl/fl} CD19Cre, rechte Spalte: IFNAR^{fl/fl} LysMCre. Obere Reihe: CD3⁺ T-Zellen, mittlere Reihe: B220⁺ B-Zellen, untere Reihe: CD11b⁺ Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen. Schwarze Linie: WT, rote Linie: IFNAR^{-/-}, grüne Linie: IFNAR^{fl/fl} Cre. Abszisse: IFNAR.

3.4 Die Rolle des IFNAR im ZNS während der EAE

3.4.1 Klinischer Verlauf der EAE in IFNAR^{fl/fl} NestinCre Mäusen

Die unter 3.1 dargestellten Ergebnisse zeigten eine deutliche, lokale IFN- β Produktion und Expression Typ 1 IFN-abhängiger Gene im ZNS während der EAE. Da der IFNAR im ZNS exprimiert wird (Griffin 2003) und Typ 1 IFN *in vitro* vielseitige Effekte auf Astrozyten und Oligodendrozyten haben (Stewart et al., 1997; Heine et al., 2006), bestand die Möglichkeit, dass die schweren EAE Symptome in den IFNAR^{-/-} Mäusen durch das Fehlen des IFNAR auf Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten verursacht wurde. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden Experimente an Mäusen

durchgeführt, in denen der IFNAR spezifisch in Zellen neuroektodermalen Ursprungs deletiert war (IFNAR^{fl/fl} NestinCre Mäuse). Als Kontrolle dienten Cre-negative Geschwistertiere.

Wie aus Abb. 3.12 hervorgeht, entwickelten die IFNAR^{fl/fl} NestinCre Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren weder in der initialen, noch in der akuten oder chronischen Phase signifikante Unterschiede im klinischen EAE Score. Auch weitere Parameter wie Inzidenz, mittlerer, maximaler oder akkumulativer Score zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede (nicht gezeigt). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die schützende Funktion des IFNAR nicht über Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten vermittelt wurde.

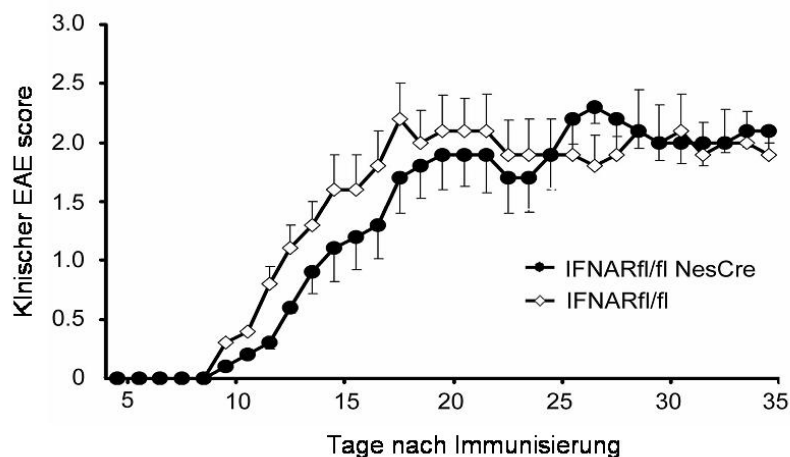


Abb. 3.11: Die Anwesenheit des IFNAR auf Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen hat keinen Einfluss auf die klinischen Symptome der EAE. Die IFNAR^{fl/fl} NestinCre (schwarze Kreise) und IFNAR^{fl/fl} (weiße Kreise) Mäuse wurden immunisiert und die klinische Symptome über 35 Tage dokumentiert. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ausgang.

3.4.2 Histopathologische Analyse der IFNAR^{fl/fl} NestinCre Mäuse

Zwar entwickelten die IFNAR^{fl/fl} NestinCre Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren keine unterschiedlichen, klinischen Symptome, es war jedoch nicht auszuschließen, dass durch das Fehlen des IFNAR auf Zellen neuroektodermalen Ursprungs das Entzündungsmuster verändert wurde. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine detaillierte histopathologische Analyse durchgeführt. Dabei wurden neben der Infiltration peripherer Makrophagen und T-Zellen auch der axonale Schaden, die Demyelinisierung und die Astrogliose quantifiziert.

Wie in Abb. 3.12 A dargestellt, waren sowohl die Zahl als auch die Verteilung der infiltrierenden Makrophagen und T-Zellen in beiden Gruppen gleich. Ebenso konnten

keine Unterschiede im Ausmaß der axonalen Schädigung, dargestellt durch APP (β -amyloid precursor protein) Ablagerungen im Gewebe (B), der Demyelinisierung der weißen Substanz (C) oder der Astrogliose (D) festgestellt werden. Die histopathologische Analyse verdeutlicht, dass der IFNAR auf Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen keinen Einfluss auf das Entzündungsmuster im ZNS hatte.

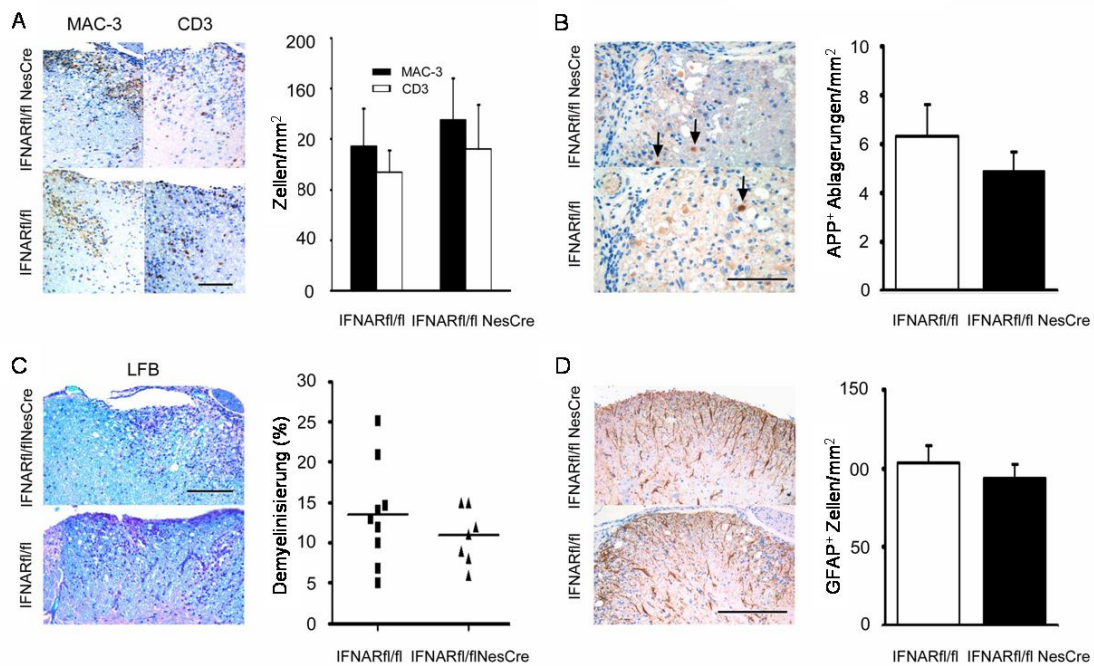


Abb. 3.12: Histopathologische Untersuchung der IFNAR^{fl/fl} NestinCre Mäuse und Cre-negativen Geschwistertiere. Übersichtsfotos der MAC-3 und CD3 gefärbten Gewebeschnitte (A, links) und Quantifizierung der Makrophagen/Mikroglia und T-Zellen (A, rechts). Übersichtsfotos der APP Färbungen (B, links) und Quantifizierung der APP Ablagerungen (B, rechts). Übersichtsfotos der LFB Färbungen (C, links) und Quantifizierung der LFB negativen Flächen (C, rechts). Übersichtsfotos der GFAP Färbungen (D, links) und Quantifizierung der GFAP⁺ Zellen (D, rechts). Luxol Fast Blue (LFB). β -amyloid precursor protein (APP). glial fibrillary acidic protein (GFAP). Messbalken: 50 μ m (A und B); 100 μ m (C und D)

3.5 T-Zell-abhängige Funktion des IFNAR während der EAE

3.5.1 Klinischer Verlauf der EAE in IFNAR^{fl/fl} CD4Cre Mäusen

Da MOG-spezifische, enzephalitogene CD4⁺ T-Zellen für die Entstehung und Progression der EAE entscheidend sind (Steinman, 2007) und Typ 1 IFN die Reifung und Proliferation von T-Zellen beeinflussen können (Bogdan et al., 2004), wurden

durch Experimente an T-Zell-spezifischen $\text{IFNAR}^{-/-}$ Mäusen ($\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD4Cre) ein möglicher Zusammenhang zwischen EAE und des IFNAR auf T-Zellen untersucht. Wie in Abb. 3.13 ersichtlich, entwickelten die $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD4Cre- und Kontrolltiere in der akuten und chronischen Phase keine signifikant unterschiedlichen Symptome. Lediglich in der frühen Phase (Tage 10 bis 13) konnten an den $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD4Cre Mäusen eine beschleunigte Progression der EAE beobachtet werden. Nach Erreichen eines klinischen Krankheitshöhepunkts (Tage 14 bis 16) waren die klinischen Symptome zwischen beiden Gruppen wieder ausgeglichen, und es konnte bis Tag 35 eine stetige, moderate Verbesserung beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die IFNAR-Expression auf T-Zellen ihre Enzephalitogenität nicht erhöhte, und somit nicht die schweren klinischen Symptome in den $\text{IFNAR}^{-/-}$ Mäusen erklärt.

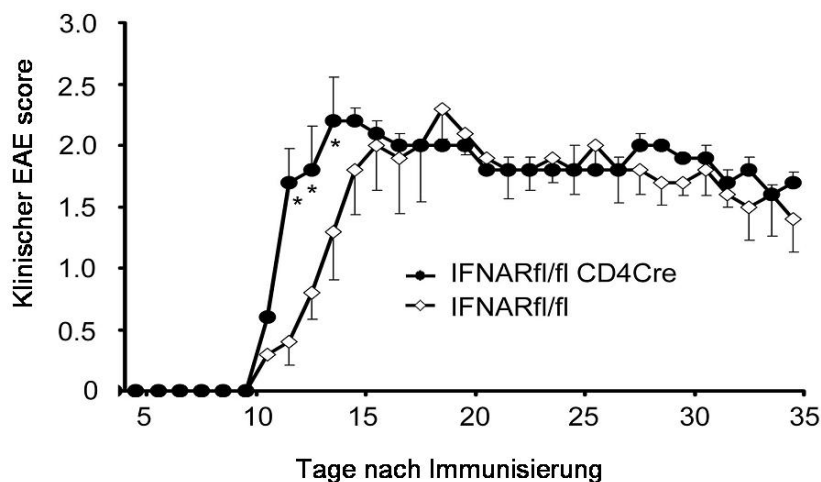


Abb. 3.13: Die spezifische Deletion des IFNAR auf T-Zellen hat keinen Einfluss auf die EAE. Die $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD4Cre (schwarze Kreise) und $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ (weiße Kreise) Mäuse wurden immunisiert und die klinische Symptome über 35 Tage dokumentiert. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ausgang. Tage mit statistisch signifikant unterschiedlichen EAE Scores sind mit Stern markiert (* $p < 0,05$)

3.5.2 Histopathologische Analyse der $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD4Cre Mäuse

Die $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD4Cre- und Kontrolltiere wurden nach Beendigung des Experiments histopathologisch untersucht. Abb. 3.14 zeigt, dass es im ZNS der T-Zell-spezifischen $\text{IFNAR}^{-/-}$ Mäuse weder zu einer veränderten Demyelinisierung (links) noch zu einer unterschiedlichen Infiltration durch Makrophagen und T-Zellen kam (rechts). Ferner waren keine Veränderungen im Entzündungsmuster der $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD4Cre Tiere erkennbar (nicht gezeigt).

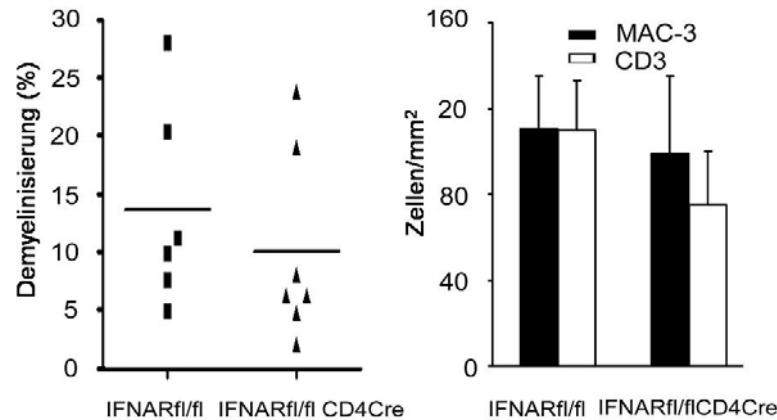


Abb. 3.14: Histopathologische Untersuchung der IFNAR^{fl/fl} CD4Cre Mäuse. Links: Quantifizierung der Demyelinisierung der weißen Substanz an LFB gefärbten Gewebsschnitten. Rechts: Quantifizierung der Mikroglia und infiltrierenden Makrophagen (MAC-3), sowie infiltrierenden T-Zellen (CD3)

3.5.3 Antigen-abhängige T-Zellproliferation und Zytokinproduktion

Da in den IFNAR^{fl/fl} CD4Cre Mäusen eine beschleunigte Progression der EAE beobachtet wurde, bestand die Annahme, dass die Proliferation der IFNAR deletierten T-Zellen erhöht sein könnte. Die These wurde gestützt durch Arbeiten, die antiproliferative Effekte der Typ 1 IFN auf T-Zellen beschrieben (Bogdan et al., 2005). Zur Überprüfung dieser These wurden Mäuse mit dem MOG Peptid immunisiert und nach 7 Tagen die MOG-abhängige Proliferation und die IL-17 Produktion der Lymphozyten gemessen. Außerdem wurden Mäuse mit dem stark immunogenen KLH (*keyhole limpet hemocyanine*) immunisiert, um eine generelle, vom Krankheitsmodell unabhängige T-Zell-Antwort zu untersuchen.

Wie in Abb. 3.15 zu sehen, stiegen in Abhängigkeit der Antigenkonzentration die Proliferation (A) und die IL-17 Produktion (B) in IFNAR^{fl/fl} CD4Cre und der Kontrollgruppe gleichermaßen an. KLH induzierte dabei eine deutlich höhere Proliferation und Zytokinproduktion als MOG. Die Daten belegen, dass die Proliferation und Zytokinproduktion durch den IFNAR auf T-Zellen nicht verändert wurde.

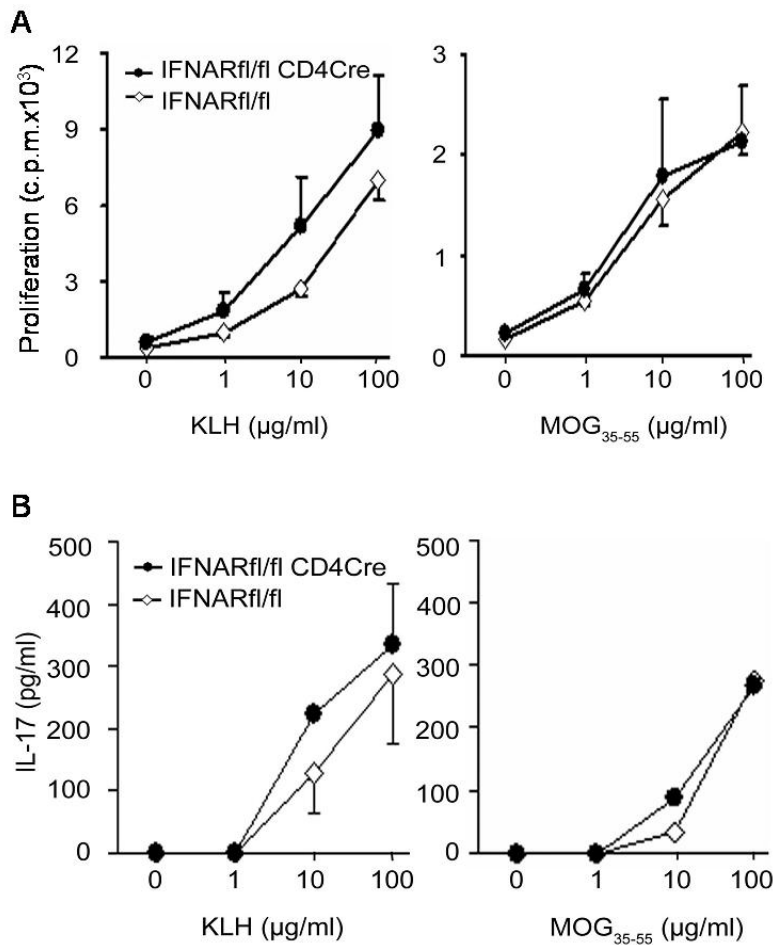


Abb. 3.15: Die Proliferation und IL-17 Produktion hängt nicht vom IFNAR auf T-Zellen ab. Die IFNAR^{fl/fl} CD4Cre (schwarze Kreise) und Cre-negativen Geschwistertiere (weiße Kreise) wurden mit MOG und KLH immunisiert und nach 7 Tagen die inguinalen und axillären Lymphknoten entnommen. Die Lymphozyten wurden anschließend isoliert und für 48 h mit den entsprechenden Peptiden restimuliert. A) Die Proliferation wurde über den Einbau radioaktiven Thymidins gemessen. B) Die IL-17 Produktion wurde mittels ELISA ermittelt. *Counts per minutes* (c.p.m.), *keyhole limpet hemocyanine* (KLH).

3.5.4 FACS-Analyse ZNS-infiltrierender T-Zellen

Die Messung der Proliferation und der IL-17 Produktion in der Primingphase der Erkrankung erbrachte keinen Hinweis auf eine regulative Funktion des IFNAR auf T-Zellen. Überdies zeigten die ELISPOT Experimente (3.2.3), dass weder in der Peripherie noch im ZNS das Verhältnis von Th1- und Th17-Zellen durch IFNAR verändert wird. Die CD4⁺ T-Zellen migrieren nach ihrer Reifung in das ZNS und werden dort reaktiviert. Eine Methode zur Überprüfung eines möglicherweise veränderten Aktivierungsstatus von IFNAR-deletierten T-Zellen in der Effektorphase ist die Messung der Aktivierungsmarker CD44 und CD62L. Aktivierte T-Zellen regulieren

CD44 hoch und verlieren ihren *homing*-Rezeptor CD62L, naive oder nicht reaktivierte T-Zellen exprimieren kaum CD44 und sind CD62L positiv (van Faassen et al., 2005). Dazu wurden aus dem Rückenmark EAE erkrankter IFNAR^{fl/fl} CD4Cre Mäuse infiltrierende, mononukleäre Zellen isoliert und durchflusszytometrisch auf ihre CD44 und CD62L Expression untersucht.

In Abb. 3.16 sind die infiltrierenden CD4⁺ Zellen aus IFNAR^{fl/fl} CD4Cre und Kontrolltieren im 2D Blot dargestellt. Über 95 % aller ZNS infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen hatten den Aktivierungsmarker CD44 hochreguliert, und nur noch ca. 30 % der Zellen exprimierten den *homing*-Rezeptor CD62L. Im direkten Vergleich zwischen den IFNAR^{fl/fl} CD4Cre T-Zellen und den Kontrollzellen waren keine Unterschiede erkennbar. Die FACS-Analyse zeigt, dass die Anwesenheit des IFNAR auf CD4⁺ Effektor T-Zellen ihren Aktivierungsstatus nicht veränderte und somit auch in der akuten Phase keinen Einfluss auf die Effektorfunktionen der T-Zellen hatte.

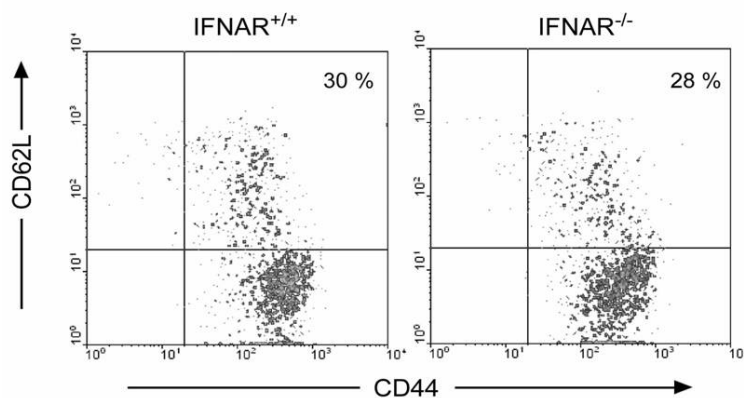


Abb. 3.16: Der IFNAR auf infiltrierenden CD4⁺ Effektor T-Zellen hat keinen Einfluss auf ihre Reaktivierung. Die Zellen wurden in der akuten Phase der Erkrankung (Tag 18) mit Dichtezentrifugation isoliert und die mononukleären Zellen mit den Markern CD4, CD44 und CD62L gefärbt. Darstellt ist ein 2D Blot (CD62L und CD44) in einem CD4 Gate.

3.6 B-Zell-abhängige Funktion des IFNAR während der EAE

3.6.1 Klinischer Verlauf der EAE in IFNAR^{fl/fl} CD19Cre Mäusen

Obwohl die MOG induzierte EAE als CD4⁺ T-Zell vermittelte Erkrankung akzeptiert ist (Steinman, 2007), wurde eine immunmodulatorische Funktion für B-Zellen beschrieben, welche durch Produktion des antiinflammatorischen IL-10 die Remission der EAE Symptome unterstützen (Fillatreau et al., 2002). Da auch bei IFN-β

behandelten MS Patienten erhöhte IL-10 Werte gemessen wurden (Ersoy et al., 2005), bestand die Möglichkeit eines Zusammenhangs zwischen der B-Zell-abhängigen IL-10 Produktion und der IFNAR-Expression in B-Zellen. Zur Untersuchung einer solchen Kausalität wurden EAE-Experimente an Mäusen mit spezifischer Deletion des IFNAR auf B-Zellen ($\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD19Cre) und in entsprechenden Kontrolltieren (Cre-negative Geschwister) durchgeführt.

Wie in Abb. 3.17 zu sehen, entwickelten die Tiere beider Gruppen ihre ersten Symptome an den Tagen 10 bis 13, welche sich kontinuierlich verschlechterten bis zum Erreichen eines Höhepunkts an den Tagen 17 bis 19. Im weiteren Verlauf kam es in beiden Gruppen ohne signifikante Unterschiede zur Remission der Symptome. Das Fehlen des IFNAR auf B-Zellen hatte also keine Auswirkungen auf den klinischen Verlauf der EAE.

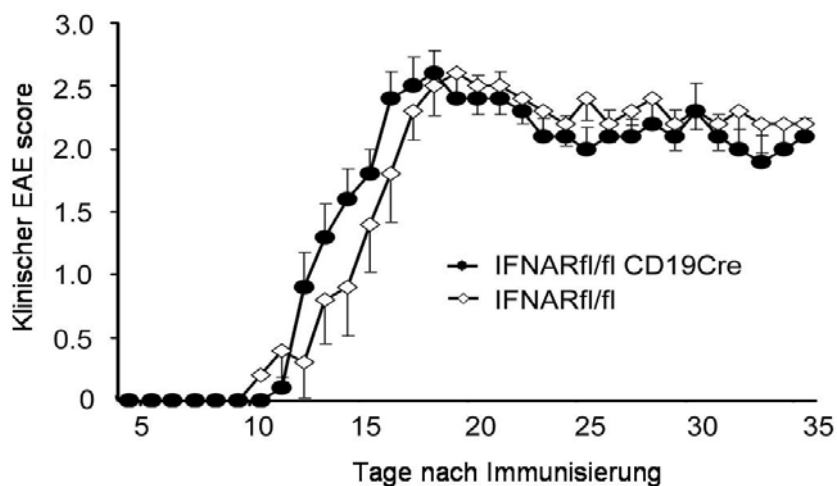


Abb. 3.17: Die spezifische Deletion des IFNAR auf B-Zellen hat keinen Einfluss auf die EAE. Die $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD19Cre (schwarze Kreise) und $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ (weiße Kreise) Mäuse wurden immunisiert und die klinische Symptome über 35 Tage dokumentiert. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ausgang.

3.6.2 Histopathologische Analyse der $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD19Cre Mäuse

Nach Beendigung des Experiments wurde das ZNS der $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD19Cre Mäuse histopathologisch untersucht. Abb. 3.18 zeigt, dass es im ZNS der Mäuse mit spezifischer Deletion des IFNAR auf B-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe weder zu einer veränderten Demyelinisierung (links) noch zu unterschiedlichen Infiltrationen von Makrophagen und T-Zellen kam (rechts). Auch die Verteilung der infiltrierenden Zellen war in den $\text{IFNAR}^{\text{fl/fl}}$ CD19Cre Mäusen nicht verändert.

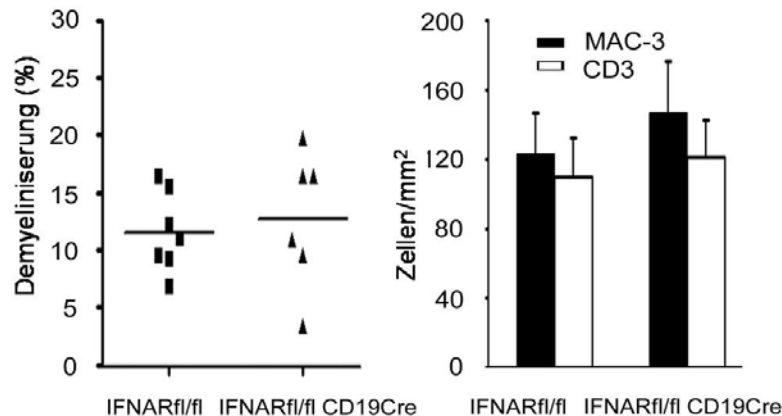


Abb. 3.18: Histopathologische Untersuchung der IFNAR^{fl/fl} CD19Cre Mäuse und Cre-negativen Geschwister. Links: Quantifizierung der Demyelinisierung der weißen Substanz an LFB gefärbten Gewebsschnitten. Rechts: Quantifizierung der Mikroglia und infiltrierenden Makrophagen (MAC-3), sowie infiltrierende T-Zellen (CD3)

3.6.3 Antigen-abhängige IL-10 Produktion von B-Zellen

Es folgte abschließend die Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen IFNAR auf B-Zellen und ihrer IL-10 Produktion *in vitro*. Dazu wurden IFNAR^{fl/fl} CD19Cre und Kontrolltiere immunisiert und in der remittierenden Phase (Tag 30) die Milzen entnommen. Aus den Splenozytensuspensionen wurden die B-Zellen magnetisch von den restlichen Zellen getrennt (MACS), in Kultur gebracht, mit MOG-Peptid und einem co-stimulatorischen CD40 Antikörper restimuliert und nach 4 Tagen die IL-10 Konzentrationen in den Überständen bestimmt.

Wie in Abb. 3.19 ersichtlich, führte die Stimulation der B-Zellen mit MOG-Peptid allein zu keiner IL-10 Produktion. Durch die Kreuzvernetzung des B-Zell Rezeptors mit einem agonistischen CD40 Antikörper kam es zu einer Produktion von IL-10, welche sich durch Co-Stimulation mit MOG₃₅₋₅₅ deutlich erhöhte. Dabei produzierten IFNAR^{-/-} B-Zellen und IFNAR^{fl/fl} B-Zellen gleiche Mengen an IL-10. Die MOG₃₅₋₅₅-abhängige IL-10 Produktion der B-Zellen wurde also nicht durch IFNAR reguliert.

Zusammenfassend zeigen die EAE Experimente, die histopathologischen Daten und die Stimulation der B-Zellen *in vitro*, dass die Deletion des IFNAR auf B-Zellen deren regulatorische Funktion nicht beeinträchtigt und den schweren EAE Verlauf der IFNAR^{-/-} Mäuse nicht verursacht haben.

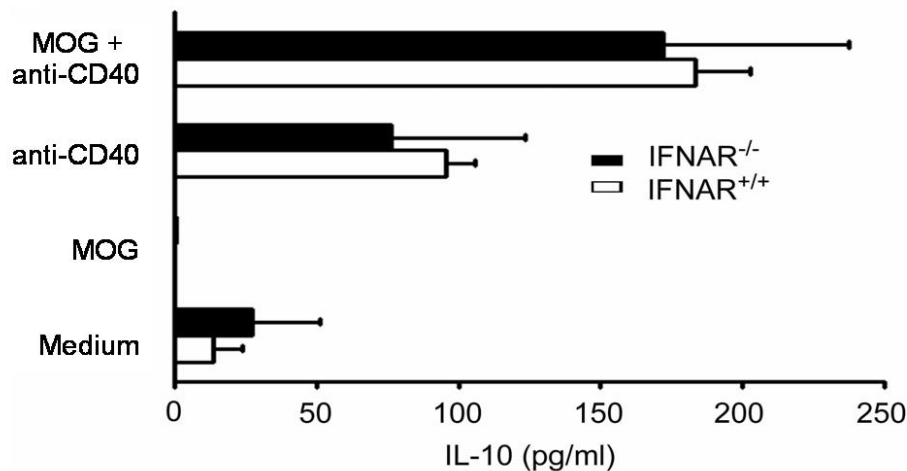


Abb. 3.19: Die IL-10 Produktion von B-Zellen hängt nicht vom IFNAR ab. Die Aufreinigung der B-Zellen aus immunisierten IFNAR^{fl/fl} CD19Cre Mäusen (weiße Säulen) und Kontrollen (schwarze Säulen) erfolgte durch einen magnetisierten CD43 Antikörper, welcher alle Leukozyten mit Ausnahme der B-Zellen bindet. Auf diese Weise wurde eine Stimulation der B-Zellen während der Aufreinigung verhindert. Die IL-10 Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt.

3.7 Die Funktion von IFNAR auf myeloischen Zellen während der EAE

3.7.1 Klinischer Verlauf der EAE in IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen

Da Makrophagen und Mikroglia maßgeblich an der Zerstörung der Myelinschicht und der Schädigung der Axone im ZNS beteiligt sind (Frohman et al., 2006) und in den EAE erkrankten IFNAR^{-/-} Mäusen eine signifikant höhere Infiltration des ZNS durch Makrophagen beobachtet wurde (3.2.2), folgte schließlich die Untersuchung des IFNAR auf myeloischen Zellen in der EAE. Dazu wurden Experimente an IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen durchgeführt, in denen der IFNAR in myeloischen Zellen deletiert ist. Wie in Abb. 3.20 dargestellt, entwickelten die Mäuse beider Gruppen die ersten klinischen Symptome an den Tagen 11 bis 13, welche schließlich an den Tagen 15 bis 17 den höchsten Wert erreichten. Während sich die Symptome der IFNAR^{fl/fl} Mäuse bis Tag 35 kontinuierlich verbesserten, entwickelten die IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäuse einen chronischen und signifikant schwereren Verlauf, eine Letalität von 33% und einen signifikant höheren, maximalen EAE Score (siehe Tab. 3.4). Die Ergebnisse belegen, dass die spezifische Deletion des IFNAR auf myeloischen Zellen ausreicht, um die EAE Symptome zu verstärken. Der IFNAR wirkt offensichtlich regulatorisch auf die pathologische Funktion der myeloischen Zellen während der EAE.

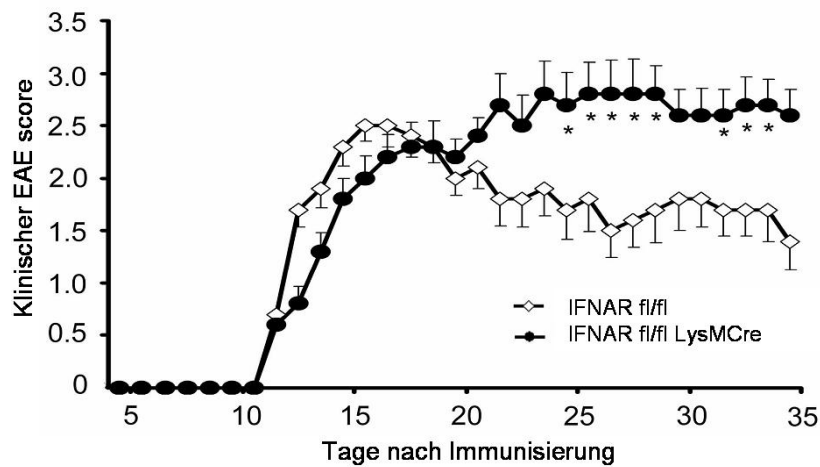


Abb. 3.20: Die spezifische Deletion des IFNAR auf myeloischen Zellen verstärkt die klinischen EAE Symptome. Die IFNAR^{fl/fl} LysMCre (schwarze Kreise) und IFNAR^{fl/fl} (weiße Kreise) Mäuse wurden immunisiert und die klinische Symptome über 35 Tage dokumentiert. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ausgang. Tage mit statistisch signifikant unterschiedlichen EAE Scores sind mit Stern markiert (* p<0,05)

Tab 3.4: Statistische Auswertung der EAE von IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen und Kontrollen aus Abb. 3.20 statistisch signifikante Werte sind mit Stern gekennzeichnet (* p<0,05)

| Maus Genotyp | Inzidenz (%) | Letalität (%) | Tag der ersten Sympt. (± SEM) | max. EAE Score (± SEM) |
|--------------------------------|--------------|---------------|-------------------------------|------------------------|
| IFNAR ^{fl/fl} LysMCre | 6/6 (100) | 33* | 14,8 ± 1,7 | 3,1 ± 0,1* |
| IFNAR ^{fl/fl} | 6/6 (100) | 0 | 12,7 ± 1,2 | 2,4 ± 0,2 |

3.7.2 IFNAR-abhängige MHCII Expression auf Makrophagen *in vitro*

Eine wesentliche Eigenschaft der Typ 1 Interferone ist die Inhibition der MHC Klasse 2 (MHCII) Expression auf myeloischen Zellen (Li et al., 1998; Kato et al., 1992). Da die MHCII Expression entscheidend für die Induktion und den Verlauf der EAE ist (Ito et al., 1996), wurde die Regulation der MHCII Expression durch Typ 1 und Typ 2 Interferone zuerst *in vitro* analysiert. Dazu wurden peritoneale Makrophagen aus

IFNAR^{fl/fl} LysMCre und IFNAR^{fl/fl} Mäusen mit IFN- γ , IFN- β oder in Kombination stimuliert und mittels FACS-Analyse die MHCII Expression bestimmt.

Wie aus Abb. 3.21 zu entnehmen, exprimierten unstimulierte Makrophagen MHCII nur schwach (dicke, schwarze Linien). Die Stimulation der Zellen mit IFN- γ hingegen führte zu einer deutlichen MHCII Heraufregulation (graue Linien). Durch Co-Stimulation der Makrophagen mit IFN- β und IFN- γ wurde die MHCII Expression inhibiert (dünne, schwarze Linie, links). In IFNAR^{fl/fl} LysMCre Makrophagen konnte wie erwartet die Inhibition durch IFN- β aufgehoben werden (links).

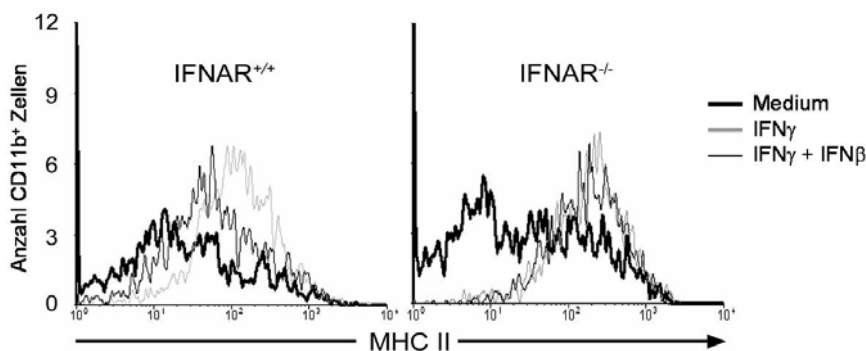


Abb. 3.21 : Inhibition der MHCII Expression durch Typ 1 IFN. Die peritonealen Makrophagen wurden *in vitro* für 18 h mit 10 ng/ml IFN- β und IFN- γ stimuliert. Für die FACS-Analyse wurden die Makrophagen mit MHCII- und CD11b Antikörpern markiert und analysiert. Im Histogramm ist die MHCII Expression im CD11b Gate dargestellt.

3.7.3 IFNAR-abhängige MHCII Expression auf Makrophagen *in vivo*

Die in 3.7.2 dargestellten Ergebnisse bestätigten eine deutliche, regulatorische Funktion des IFN- β auf die MHCII Expression in Makrophagen *in vitro*. Es stellte sich nun die Frage, ob das unter 3.1.1 beschriebene, endogene IFN- β die MHCII Expression der Makrophagen und Mikroglia auch *in vivo* regulierte, und durch das Fehlen des IFNAR auf myeloischen Zellen eine erhöhte MHCII Expression zur Folge hatte. Zur Klärung dieser Frage wurden mononukleäre Zellen aus dem ZNS erkrankter IFNAR^{fl/fl} LysMCre und Kontrolltiere isoliert und die MHCII Expression der myeloischen Zellen gemessen.

Abb. 3.22 zeigt die MHCII Expression der CD11b⁺ Zellen im ZNS. Während die aus den IFNAR^{fl/fl} Mäusen isolierten Zellen eine intermediäre MHCII Expression aufwiesen (links), waren auf IFNAR^{fl/fl} LysMCre Zellen zwei distinkte CD11b⁺ Populationen zu erkennen, von denen eine schwach und die zweite stark MHCII produzierte.

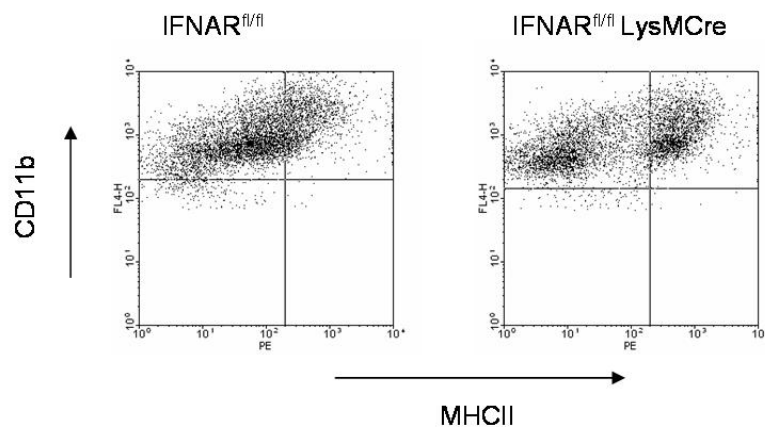


Abb. 3.22 : Erhöhte MHCII Expression in IFNAR deletierten, myeloischen Zellen. Für die FACS-Analyse wurden in der akuten Phase der EAE (Tag 18) mononukleäre Zellen mittels Dichtezentrifugation aus dem ZNS der IFNAR^{fl/fl} LysMCre und Kontrolltiere isoliert und mit MHCII- und CD11b Antikörpern markiert und analysiert.

Zur weiteren Differenzierung der in 3.7.3 untersuchten myeloischen Zellen wurden die Marker Ly6C, CD45 hinzugezogen, mit denen im CD11b Gate die spezifische MHCII Expression auf Mikroglia, Makrophagen und Granulozyten auf folgende Weise dargestellt werden konnte:

CD11b⁺, CD45^{hoch}, MHCII⁺, Ly6C⁺ Zellen: inflammatorische und residente Monozyten
(rot umrandetes oberes Feld)

CD11b⁺, CD45^{niedrig}, MHCII⁺, Ly6C⁻ Zellen: Mikroglia
(rot umrandetes unteres Feld)

CD11b⁺, CD45^{hoch}, MHCII⁻, Ly6C⁺ Zellen: Granulozyten
(restliche, nicht umrandete Zellen)

Abb. 3.23 zeigt eine deutliche MHCII Expression auf Mikroglia und Makrophagen. Granulozyten hingegen exprimierten kein MHCII. In IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen war insbesondere die MHCII Expression der Mikroglia deutlich höher als in IFNAR^{fl/fl} und erreichte hier das gleiche Niveau wie das der infiltrierenden Makrophagen.

Da derzeit unklar ist, ob in LysMCre Mäusen die Cre-Rekombinase in Mikroglia aktiv ist und zur Deletion loxP flankierter Gene führt, wurden Southern Blot Analysen mit DNA aus Mikroglia kulturen der IFNAR^{fl/fl} LysMCre und Cre-negativen Mäuse durchgeführt. Die Analyse zeigte eine deutliche Deletionsbande in IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mikroglia (nicht gezeigt), was eine Deletion des IFNAR in Mikroglia belegt. Weiterführende Charakterisierungen der Deletionseffizienz sind geplant.

Die FACS-Analysen zeigen, dass auch *in vivo* durch IFNAR die MHCII Expression der myeloischen Zellen, insbesondere der Mikroglia, reguliert wird und die zellspezifische Deletion des IFNAR diese Regulation aufhebt.

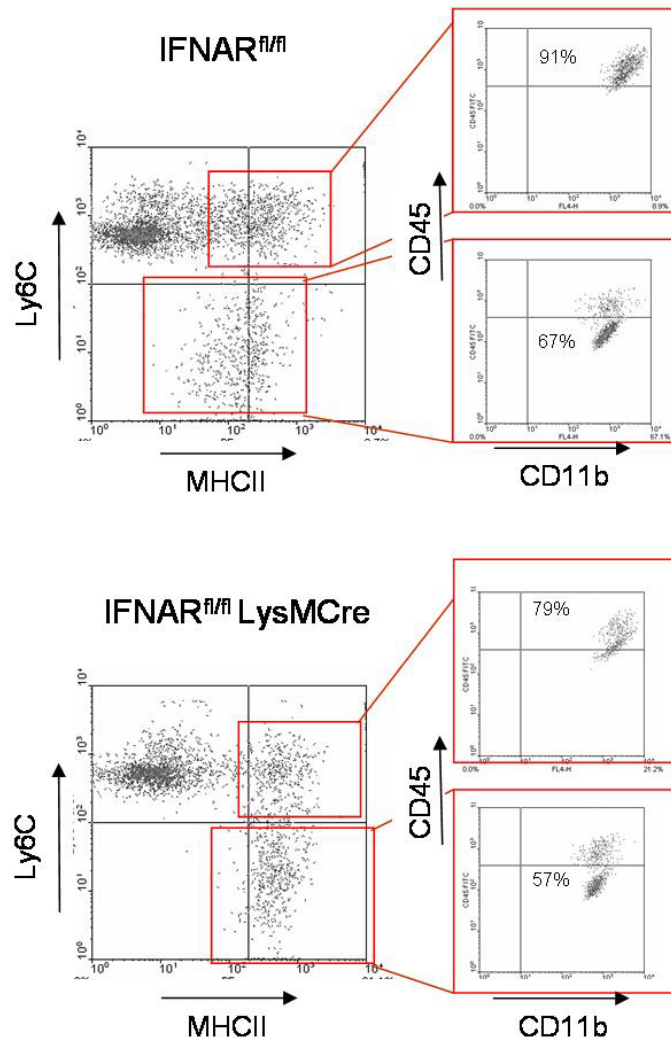


Abb. 3.23 : Erhöhte MHCII Produktion in IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mikroglia. Für die FACS Analyse wurden in der akuten Phase der EAE (Tag 18) mononukleäre Zellen mittels Dichtezentrifugation aus dem ZNS der IFNAR^{fl/fl} LysMCre und Kontrolltiere isoliert und mit MHCII, Ly6C, CD45 und CD11b Antikörpern markiert und analysiert.

3.7.4 Der Einfluss von IFN- β auf die Myelinphagozytose

Eine wesentliche Eigenschaft der infiltrierenden Makrophagen und aktivierten Mikroglia in der EAE und MS ist die Zerstörung der Markscheiden und die sich anschließende Myelinphagozytose (Boven et al., 2006). Um zu prüfen, ob das endogene IFN- β auch

diese Funktionen beeinflusst, wurden *in vitro* die Myelinphagozytose durch Makrophagen in An- und Abwesenheit von IFN- β untersucht. Dazu wurden peritoneale Makrophagen zeitabhängig mit FITC-gekoppeltem Myelin inkubiert und die phagozytierenden Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Um sicher zu gehen, dass in der FACS-Analyse nicht unspezifisch an der Zellwand gebundenes Myelin gemessen wird, wurden zunächst konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von phagozytierenden Makrophagen gemacht, welche nach Beendigung der Phagozytose mit einem Lysosomenfarbstoff (LysoTracker) angefärbt wurden. Die Aufnahmen in Abb. 3.24 (links) zeigen eine klare Co-Lokalisation der angefärbten Lysosomen mit dem FITC-gekoppelten Myelin, was für eine spezifische Phagozytose des Myelins in die Zelle spricht. Wie aus Abb. 3.24 (rechts) hervorgeht, nahm die Phagozytose, dargestellt durch den MFI-Wert des FITC-Farbstoffs, in Abhängigkeit der Zeit stetig zu. In Anwesenheit von IFN- β hingegen war die Phagozytose des Myelins durch die Makrophagen deutlich herabgesetzt. Durch Cytochalasin D, ein Inhibitor des Aktinfilamentes, konnte die Phagozytose stark gehemmt werden.

Die Ergebnisse belegen, dass IFN- β die Myelinphagozytose moduliert, und dass diese regulatorische Funktion durch das Fehlen des IFNAR auf myeloischen Zellen möglicherweise aufgehoben wird.

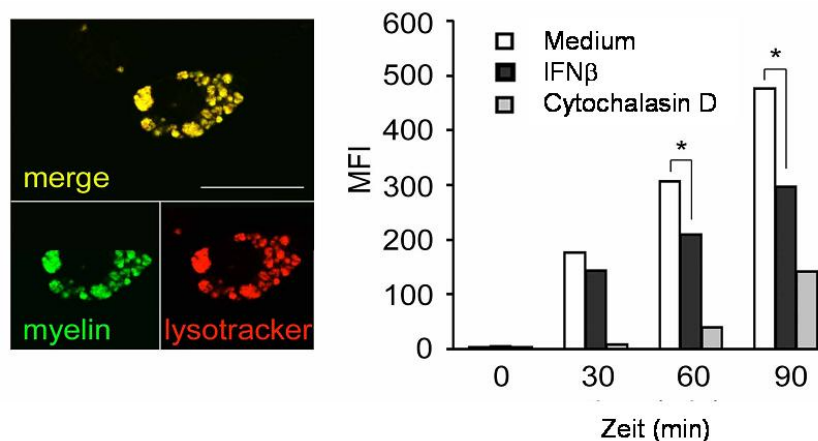


Abb. 3.24 : IFN- β hemmt die Myelinphagozytose in Makrophagen. Die peritonealen Makrophagen wurden mit 4 $\mu\text{g/ml}$ FITC-gekoppeltem Myelin inkubiert und die Phagozytose des Myelins über den MFI-Wert des FITC-Farbstoffs durchflusszytometrisch bestimmt (rechts). Für die konfokalen Aufnahmen wurden die Zellen nach Beendigung der Phagozytose mit 0,1 μM LysoTracker für 30 min angefärbt (links). *Mean fluorescence intensity (MFI)*

3.7.5 Der Einfluss von IFN- β auf die Chemokinproduktion von Makrophagen

Die in 3.7.3 und 3.7.4 dargestellten Ergebnisse demonstrierten regulatorische Funktionen des IFNAR auf die MHCII Expression und auf die Myelinphagozytose. Es war deshalb nicht auszuschließen, dass weitere Effektorfunktionen der myeloischen Zellen durch die Deletion des IFNAR betroffen waren. Da eine wesentliche Funktion von infiltrierenden, aktivierten Makrophagen die Freisetzung chemotaktischer Proteine und Zytokine ist, sollte der Einfluss von Typ 1 IFN auf die Produktion verschiedener Chemokine und Zytokine untersucht werden. Dazu wurden peritoneale Makrophagen mit LPS, TNF- α und jeweils in Kombination mit IFN- β stimuliert und die Zytokin- und Chemokinproduktion gemessen.

Die Stimulation der Makrophagen mit LPS induzierte eine deutliche Produktion von CXCL1 (KC) und CXCL2 (MIP2). Die Konzentrationen zwischen den verschiedenen Cre-Mauslinien zeigten dabei keine signifikanten Unterschiede (nicht gezeigt). Wie in Abb. 3.25 A zu sehen, wurde die Produktion beider Chemokine durch Co-Stimulation mit IFN- β in IFNAR^{fl/fl}, IFNAR^{fl/fl} CD4Cre und IFNAR^{fl/fl} CD19Cre Makrophagen stark inhibiert. Die Deletion des IFNAR (IFNAR^{fl/fl} LysMCre und IFNAR^{-/-} Makrophagen) führte zu einer Aufhebung der IFN- β -abhängigen Inhibition. Die Zytokinproduktion (IL-6, IFN- γ , TNF- α) hingegen wurde durch IFN- β nicht reguliert (nicht gezeigt). Auf spezielle Weise schien die CCL2 (MCP-1) Produktion durch Typ 1 IFN reguliert zu werden: Während die LPS Stimulation zu einer starken CCL2 Produktion führte, war das Chemokin in IFNAR^{-/-} Makrophagen nicht induzierbar (Abb. 3.25 B, oben). Jedoch konnte durch Co-Stimulation der WT Makrophagen mit IFN- β die CCL2 Produktion stark inhibiert werden. Obwohl IFNAR für die Induktion von CCL2 notwendig ist, führt seine Stimulation durch IFN- β zur Inhibition der CCL2 Produktion. Eine weitere Besonderheit zeigte die Typ 1 IFN Abhängigkeit der CCL5 (RANTES) Produktion. Nur durch Co-Stimulation der Makrophagen mit TNF- α und IFN- β wurde CCL5 induziert, während in IFNAR^{-/-} Makrophagen kein CCL5 induzierbar war (Abb. 3.25 B, unten).

Zusammenfassend belegen die Daten eine komplexe, regulatorische Funktion des IFNAR auf die Produktion verschiedener Chemokine, die auch für den Verlauf der EAE entscheidend sind. Die Deletion des IFNAR führte damit zu einer starken Veränderung des gesamten Chemokinprofils, welches möglicherweise additiv zu der überhöhten MHCII Expression und Myelinphagozytose die schweren, klinischen Symptome in den IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen verursachte.

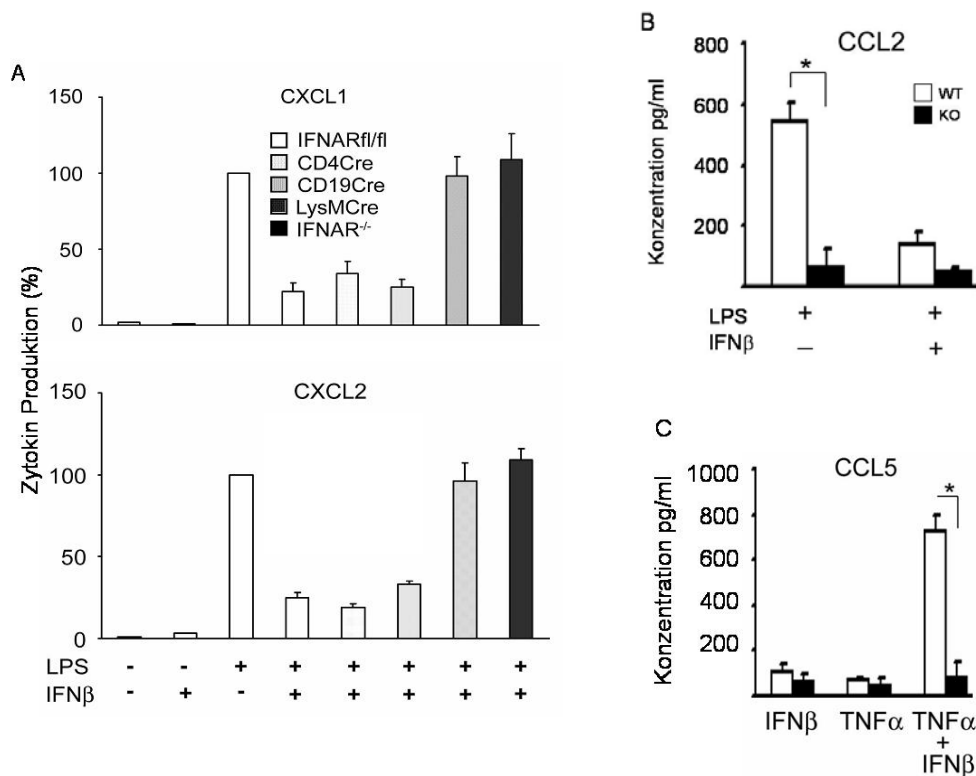


Abb. 3.25: IFNAR reguliert die Produktion chemotaktischer Proteine in myeloischen Zellen. Die peritonealen Makrophagen wurden nach der Isolierung und Ausplattierung 2 Tage in Kultur gelassen und mit 10 ng der verschiedenen Liganden stimuliert. Die Konzentration nach LPS Stimulation wurde als 100 % definiert (A). *CXC motif ligand* (CXCL). *CC motif ligand* (CCL).

3.7.6 T-Zellproliferation und Zytokinproduktion in IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen

Die in 3.5.3 dargestellten Resultate belegen, dass der IFNAR auf T-Zellen die Ag-abhängige Proliferation und Zytokinproduktion nicht verändert. Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt durch antigenpräsentierende Zellen (APC), (Billadeau et al., 2007), welche z.T. in den IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen IFNAR deletiert sind. Um zu untersuchen, ob die Aktivierung der T-Zellen durch das Fehlen des IFNAR auf bestimmten APCs verändert ist, wurde die MOG₃₅₋₅₅-abhängige Proliferation und IL-17 Produktion von Lymphozyten aus IFNAR^{fl/fl} LysMCre und IFNAR^{fl/fl} Mäusen gemessen. Wie in Abb. 3.26 A verdeutlicht, konnte bereits 4 Tage nach Immunisierung eine von der MOG₃₅₋₃₅-Konzentration abhängende Proliferation der Lymphozyten beobachtet werden. An den Tagen 7 und 14 nach Immunisierung stieg die Proliferation weiter an, wobei zu keinem Zeitpunkt und bei keiner MOG₃₅₋₃₅-Dosis signifikante Unterschiede zwischen IFNAR^{fl/fl} LysMCre und IFNAR^{fl/fl} Lymphozyten gemessen wurden. Eine MOG₃₅₋₃₅-abhängige IL-17 Produktion konnte an Tag 4 nicht nachgewiesen werden

(nicht gezeigt), an den Tagen 7 und 14 (Abb. 3.26 B) war hingegen eine deutliche IL-17 Produktion zu beobachten, wobei auch hier keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen festzustellen waren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen des IFNAR auf myeloischen Zellen die Reifung und Expansion der T-Zellen nicht beeinflusst.

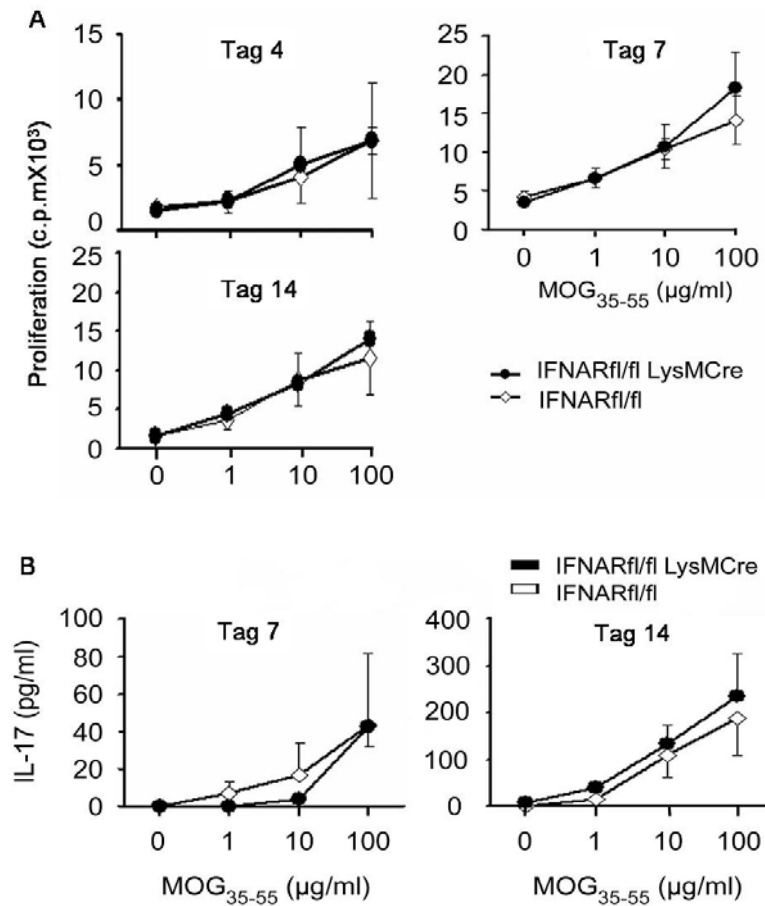


Abb. 3.26: Die Proliferation und IL-17 Produktion von Lymphozyten hängen nicht vom IFNAR auf myeloischen Zellen ab. Die IFNAR^{fl/fl} LysMCre (schwarze Kreise) und Cre-negativen Geschwistertiere (weiße Kreise) wurden mit MOG immunisiert und nach 4, 7 und 14 Tagen die inguinalen und axillären Lymphknoten entnommen. Die Lymphozyten wurden isoliert und für 48 h mit MOG restimuliert. A) Die Proliferation wurde über den Einbau radioaktiven Thymidins gemessen. B) Die IL-17 Produktion wurde mittels ELISA ermittelt. *Counts per minutes* (c.p.m.)

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Typ 1 Interferon Rezeptors (IFNAR) auf die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, dem Tiermodell der multiplen Sklerose, untersucht. Ziel der Arbeit war, herauszufinden, auf welche Weise der Rezeptor den klinischen Verlauf der EAE moduliert und auf welchen Zelltypen die Expression des IFNAR für die Modulation entscheidend ist. Ferner sollten molekulare Mechanismen, denen Die Wirkung der Typ 1 Interferone zugrunde liegt, aufgeklärt werden.

4.1 Die Bedeutung von Tiermodellen für das Verständnis der MS

4.1.1 Pathologische Mechanismen in der EAE und der MS im Vergleich

Im Gegensatz zur EAE, welche durch Injektion eines Myelinpeptid/Adjuvans-Gemisch induziert wird, ist die multiple Sklerose eine spontan auftretende Erkrankung mit nicht völlig aufgeklärter Ursache. Dennoch beruhen viele Erkenntnisse und Vorstellungen der Erkrankung auf den verschiedenen Tiermodellen (Friese, 2006).

In den Läsionen von MS Patienten sind wie in der EAE vergleichbare, pathologische Prozesse wie die Demyelinisierung der weißen Substanz, axonale Schädigung, Astrogliose und die Infiltration des ZNS durch T-Zellen und Makrophagen zu finden (Lassmann et al., 1998). Die Annahme, dass die MS wie auch die EAE eine Autoimmunerkrankung ist, wird unterstützt durch die Tatsache, dass bisher in den Läsionen und im ZNS der Patienten kein Pathogen gefunden wurde, welches als direkter Auslöser der Erkrankung verantwortlich gemacht werden kann (Hafler et al., 2005). Die Entdeckung von autoreaktiven, gegen Myelinpeptide gerichtete T-Zellen im ZNS Gewebe von Patienten (Ota et al., 1990) sowie das Auftreten von oligoklonalen Immunglobulinen im Liquor (Kabat et al., 1948) sind ein weiterer Hinweis für die Annahme, dass die MS eine durch Autoimmunität vermittelte Erkrankung ist.

Aufgrund des starken Modellcharakters war die EAE in der Vergangenheit ein hilfreiches Mittel für die Entwicklung neuer Therapieansätze für die MS. Besonders soll hier die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen das α_4 -Integrin hervorgehoben werden, ein Adhensionsmolekül, welches wichtig für die Migration von T-Zellen in entzündetes Gewebe ist und in der EAE erfolgsversprechende, therapeutische Effekte gezeigt hat (Yednock et al., 1992). Die Erkenntnisse konnten

direkt zur Entwicklung eines wirksamen Medikaments und zur Durchführung klinischer Studien verwendet werden (Miller et al., 2003). Trotz Nebenwirkungen (Yousry et al., 2006) wurde der Wirkstoff zur Blockade von α_4 -Integrin als Medikament unter strengen Auflagen zugelassen und ist derzeit ein viel versprechendes Therapeutikum, dessen Wirkungsmechanismus durch Tiermodelle erkannt wurde. Als weiteres Beispiel ist hier die Substanz FTY720 zu nennen, welche in Mäusen Sphingosin-1-Phosphat (S1P) Rezeptoren herunterreguliert, dadurch den Austritt aktivierter T-Zellen aus dem Thymus verhindert (Matloubian et al., 2003) und in klinischen Studien signifikant die Schubrate bei MS verringerte (Kappos et al., 2006).

Allerdings sind zwischen EAE und MS auch entscheidende Unterschiede hervorzuheben, die die Wertigkeit des Tiermodell für das Verständnis der MS begrenzen. Die in der EAE verwendeten Mäuse sind Inzuchtstämme mit stark eingeschränkter genetischer Diversität, die unter pathogenfreien, konstanten äußeren Bedingungen und festgelegter Ernährungsweise gehalten werden. Abweichend von der großen Bandbreite an klinischen Symptomen bei der MS zeigt die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE in C57B6/J Mäusen einen monophasischen Verlauf mit nur schwacher Varianz zwischen den Versuchstieren. Während bei der MS die Läsionen vornehmlich am Nervus Optikus und in der weißen Substanz des Hirnstamms und Rückenmarks zu finden sind, beschränkt sich die Entmarkung in der EAE hauptsächlich auf das Rückenmark. Histologisch gibt es bei der MS vielfältige Erscheinungsformen, die möglicherweise auf verschiedene Mechanismen der Erkrankung zurückzuführen sind (Luccinetti et al., 1996), wohingegen das histopathologische Entzündungsmuster in der EAE sehr einheitlich ist, gekennzeichnet durch massive parenchymal verteilte Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen. B-Zellen sind in der EAE nur außerhalb der Läsionen, perivaskulär und meningeal zu finden, während sie bei der MS vor allem im fortgeschrittenen Stadien in den chronischen MS Plaques nachweisbar sind (Lassmann et al., 2007). Darüber hinaus gibt es generelle Abweichungen im Immunsystem zwischen Maus und Mensch, welche bei der Suche nach therapeutischen Angriffspunkten zu berücksichtigen sind. So ist z.B. das Verhältnis von Lymphozyten und myeloischen Zellen im Blut von Mäusen höher als bei Menschen (Doeing et al., 2003) und die Expression des CD4 Moleküls in Mäusen auf Lymphozyten beschränkt, während bei Menschen auch Makrophagen CD4 exprimieren können (Crocker et al., 1987). Ferner sind einige auf menschlichen Lymphozyten gefundene Oberflächenmarker wie CD52 in der Maus nicht vorhanden oder noch nicht entdeckt (Tone et al., 1999). Die für die Antigenpräsentation wichtige MHC Klasse 2 Expression ist im Gegensatz zu Menschen bei der Maus auf T-Zellen nicht zu finden (Taams et al., 1999).

Dementsprechend erwiesen sich einige aus der EAE abgeleitete Therapieversuche für den Menschen als nicht übertragbar. Eindrücklich zeigte dies die Blockade von TNF- α durch monoklonale Antikörper, welche den klinischen Verlauf der EAE in Mäusen verbesserte. Bei MS Patienten hingegen führte die Behandlung zu einer verstärkten MRI (*magnet resonance imaging*) Aktivität der Läsionen und erhöhten Immunaktivität (Ruddle et al., 1990; van Oosten et al., 1996). Ein weiteres Beispiel ist die Applikation von IFN- γ , welches in der EAE eine Verbesserung, bei der MS jedoch eine Verschlechterung der Symptome verursachte (Krakowski und Owens, 1996; Panitch et al., 1987). Ferner schlugen die an Mäusen erfolgreich getesteten Applikationen von IL-10 (Wiendl et al., 2000), anti-CD40L (Dumont 2002), anti-CD4 (van Oosten et al., 1997) u.a. wegen Wirkungslosigkeit oder schweren Nebenwirkungen fehl.

4.1.2 Das Typ 1 IFN System der Maus und des Menschen

Im Gegensatz zu den unter 4.1.1 beschriebenen, neuartigen Therapieansätzen ist die Wirkung von IFN- β bei MS nicht primär an Tierexperimenten entdeckt worden (Paty et al., 1993). Da die Resultate bezüglich des Einflusses der Typ 1 IFN auf die EAE widersprüchlich sind (siehe 3.), sollen im folgenden Vergleiche des Typ 1 IFN Systems zwischen Mensch und Maus angestellt werden. Außerdem soll erörtert werden, inwieweit das Mausmodell auf die menschliche Situation übertragbar ist.

Bei allen Vertebraten aus der Überklasse der Gnathostomata (Kiefermäuler) setzt sich die Gruppe der Typ 1 Interferone aus IFN- β und verschiedenen IFN- α Subtypen zusammen. In der Maus sind 14 IFN- α und 3 IFN- α -Pseudogene bekannt, wohingegen beim Menschen 12 IFN- α Subtypen identifiziert sind. Ferner sind für Maus und Mensch IFN- ε , IFN- κ , IFN- ω und bei Mäusen zusätzlich IFN- δ und Limitin (Hardy et al., 2004) beschrieben. Alle Typ 1 IFN Subtypen haben in ihrer Wirkung stark überlappende, pleiotrope Eigenschaften und binden an den IFNAR, welcher sich aus den transmembranen Proteinen IFNAR1 und IFNAR2 zusammensetzt (Pestka et al., 2004). Sowohl in Maus als auch Mensch zeichnen sich die Typ 1 IFN durch ihre starken, antiviralen Eigenschaften aus (Stetson und Medzhitov, 2006). Ihr Einfluss erstreckt sich auf nahezu alle immunologisch relevanten Zelltypen wie Makrophagen, T-, B-, NK Zellen, dendritische Zellen und können je nach Zelltyp die Proliferation, Zytokin- und Chemokinproduktion, Zellreifung- und Differenzierung u.a. beeinflussen (Bogdan et al., 2004). Auch hier sind zwischen Maus und Mensch große Übereinstimmungen beschrieben wie z.B. die IL-12 Inhibition in dendritischen Zellen durch IFN- β (Dalod et

al., 2002; Bartholome et al., 1999) oder NK-Zell Toxizität (Nguyen et al., 2002a; Allayena et al., 1998).

Artspezifische Unterschiede im Typ 1 IFN System zwischen Mensch und Maus konnte bisher an der Th-Zelldifferenzierung beobachtet werden: Die Stimulation von menschlichen T-Zellen durch IFN- α induzierte unter bestimmten Bedingungen die Produktion von IFN- γ , eine Eigenschaft, die an murinen T-Zellen unter gleichen Bedingungen nicht beobachtet werden konnte (Rogge et al., 1999). Rogge et al. zeigten außerdem, dass durch IFN- α Stimulation in menschlichen, aber nicht in murinen Zellen STAT4 phosphoryliert wurde. STAT4 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor in der Th1 Differenzierung. Später konnte gezeigt werden, dass die STAT4 Phosphorylierung STAT2-abhängig ist und dass das Gen dieses Transkriptionsfaktors in der Maus eine Insertion trägt, wodurch er seine Fähigkeit zur STAT4 Phosphorylierung verliert. Außerdem zeigte sich, dass das bei viralen Infektionen von Mäusen produzierte Typ 1 IFN die IFN- γ Produktion inhibiert und dass diese Inhibition STAT1-abhängig ist (Nguyen et al., 2000). Ein vergleichbares Zusammenwirken zwischen Typ 1 IFN und IFN- γ konnte bei Menschen bisher nicht gezeigt werden. Allerdings findet in der Maus bei bestimmten Infektionen eine Typ 1 IFN abhängige IFN- γ Induktion statt, die STAT1-unabhängig ist und über alternative Signalwege kompensiert werden kann (Nguyen et al., 2002b).

4.1.3 Typ 1 IFN assoziierte, autoimmunologische Prozesse

In der Erforschung verschiedener Autoimmunerkrankungen wird seit Jahrzehnten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Typ 1 IFN und autoimmunologischen Prozessen hingewiesen (Hooks et al., 1979). Dabei scheinen Typ 1 IFN sowohl eine pathologische als auch eine schützende Funktion zu haben.

Im Serum von Patienten mit systemischen Lupus Erythematodes (SLE) konnten z.B. chronisch überhöhte IFN- α Werte gemessen werden (Preble et al., 1982). Überdies wurde eine Assoziierung zwischen SLE und IRF5 Polymorphismen entdeckt (Graham et al., 2007); IRF5 ist ein Typ 1 IFN induzierbarer Transkriptionsfaktor. Verschiedene Tiermodelle, in denen eine SLE ähnliche Erkrankung durch verschiedene Genmutationen verursacht wird, unterstützen die Hypothese, das Typ 1 IFN eine krankheitsfördernde Funktion haben. Dabei konnte SLE-Mäusen in der präklinischen Phase durch IFN- α Applikation das Auftreten der klinischen Symptome beschleunigt und verstärkt werden. Überraschenderweise entwickelten IFNAR^{-/-} Mäuse SLE je nach

Modell einen milderen Verlauf (Braun et al., 2003) oder eine verstärkte Erkrankung (Hron und Peng, 2004).

Auch bei Typ 1 Diabetes mellitus gibt es Hinweise auf eine Mitwirkung von Typ 1 IFN. So konnten in Diabetes Patienten überhöhte IFN- α Konzentrationen im Serum und eine höhere IFN- α Expression im Pankreas nachgewiesen werden (Huang et al., 1995). Hepatitis C- sowie Leukämie Patienten, die mit IFN- α behandelt wurden, erkrankten häufiger an Diabetes (Fabris et al., 2003; Guerci et al., 1994). Der Zusammenhang zwischen Typ 1 IFN und Diabetes konnte auch durch Tierexperimente bestätigt werden: Durch transgene IFN- α Expression in der Pankreas und der Induktion von Typ 1 IFN durch PolyI:C Applikation in Mäusen und Ratten konnte Diabetes induziert werden (Stewart et al., 1993; Ewel et al., 1992). Interessanterweise konnten die Inzidenz und die Symptome der Diabetes bei Mäusen durch Applikation von IFN- α und niedrig dosiertem PolyI:C verringert werden (Sobel et al., 1998).

Ferner konnten Zusammenhänge zwischen Typ 1 IFN und weiteren Autoimmunkrankheiten wie Myasthenia gravis, rheumatoider Arthritis, Sjögrens Syndrom u.a. hergestellt werden (Baccala et al., 2005).

Die hier zusammengefassten Studien verdeutlichen, dass es klare Zusammenhänge zwischen Autoimmunität und dem Typ 1 IFN System gibt, und dass diese durch Tiermodelle dargestellt werden können.

4.2 Die schützende Funktion des IFNAR in der EAE

4.2.1 Der Einfluss des IFNAR auf die EAE

Zur Untersuchung der Funktion des IFNAR in der EAE wurden zunächst an erkrankten Mäusen die krankheitsassoziierte Produktion seiner Liganden, IFN- α und IFN- β , untersucht. Dabei wurde ein deutlicher Anstieg der IFN- β Konzentration im ZNS beobachtet, wohingegen im Blut keine Typ 1 IFN Produktion nachweisbar war (3.1.1). Northern Blot Analysen zeigten, dass die endogene IFN- β Produktion zur Induktion Typ 1 IFN abhängiger Gene führte. Es wurde hingegen nicht ermittelt, welcher Zelltyp das ZNS-spezifische IFN- β produzierte. In Frage kommen plasmazytoide dendritische Zellen (pDC), die in den letzten Jahren als wichtiger Typ 1 IFN produzierender Zelltyp bei viralen Infektionen und Autoimmunität identifiziert werden konnte (Ito et al., 2006). Während myeloischen DC in der EAE pathologische Funktionen wie eine Reaktivierung von enzephalitogenen T-Zellen und „epitope spreading“ übernehmen, ist

die Rolle der pDC im ZNS von erkrankten Tieren unklar (Bailey et al., 2007). Möglicherweise geht von diesen DC Subtypen eine regulatorische Funktion aus, die durch Typ 1 IFN bestimmt wird. Dies könnte mit EAE Experimenten beantwortet werden, bei denen die pDC selektiv durch einen depletierenden Antikörper eliminiert und so aus dem Krankheitsprozess entfernt werden. Neben den pDC wäre aber auch eine IFN- β Produktion durch gliale Zellen denkbar, wie sie auch bei viralen Infektionen in Neuronen (Delhaye et al., 2006) und bei Mikroglia *in vitro* zu beobachten ist (Town et al., 2006). Es bleibt außerdem zu klären, welche Faktoren zur Induktion des IFN- β geführt haben. Sowohl für pDC als auch gliale Zellen wäre eine Induktion über verschiedene Toll-Like Rezeptoren (TLR) denkbar, die in den Läsionen durch endogene Liganden stimuliert werden und so die IFN- β Produktion induzieren. Hier käme insbesondere TLR3 in Frage, ein Rezeptor, welcher doppelsträngige RNA erkennt und über das Signalmolekül TRIF die IFN- β Produktion induziert (Honda et al., 2006). Hier wäre eine Stimulation des TLR3 durch endogene Liganden denkbar, welche durch apoptotische Zellen in den Läsionen freigesetzt werden. Unterstützung findet diese Hypothese durch EAE Experimente unserer Arbeitsgruppe an TRIF^{-/-} und TLR3^{-/-} Mäusen, welche schwerere, klinische EAE Symptome entwickelten. Der immunmodulatorische Einfluss des TLR9, ein Rezeptor für CpG-DNA (Hacker et al., 2000), wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Prinz et al., 2006). EAE Experimente an IFNAR^{-/-} Mäusen zeigten, dass das endogene, im ZNS produzierte IFN- β eine schützende Funktion für den Krankheitsverlauf hatte, da die IFNAR^{-/-} Mäuse deutlich schwerere EAE Symptome entwickelten (3.2.1). Histopathologische Untersuchungen ergaben, dass eine signifikant höhere Infiltration von Makrophagen in das ZNS der IFNAR^{-/-} Mäuse stattgefunden hatte, die Zahl der infiltrierenden T-Zellen hingegen unverändert blieb (3.2.2). Die Infiltration von entzündetem Gewebe ist ein komplexer Prozess, welcher durch die Expression von Adhäsionsmolekülen, Endothelaktivierung und Chemokinproduktion gesteuert wird (Mantovani et al., 2006; Luster et al., 2005). Es wurde deshalb in der akuten Phase der EAE die Expression verschiedener Chemokine im ZNS von IFNAR^{-/-} und WT Mäusen analysiert (3.2.4). Dabei zeigte sich, dass insbesondere CCL2 und CXCL10 in IFNAR^{-/-} signifikant höher exprimiert wurde. Die höhere Expression dieser beiden Chemokine könnte die massive Infiltration von Makrophagen und Aktivierung von Mikroglia erklären, da CCL2 chemotaktisch auf myeloische Zellen wirkt (Rollins, 1996). CXCL10 lockt zwar aktivierte T-Zellen an, wird jedoch selbst in frühen Phasen von Entzündungen im ZNS von Mikroglia synthetisiert (Shen et al., 2006). CCL5 und CCL12 hingegen, welche chemotaktisch auf Monozyten und T-Zellen wirken, waren

nicht signifikant verändert. Das Ergebnis erscheint vor dem Hintergrund überraschend, da insbesondere CCL2 als Typ 1 IFN abhängiges Zytokin beschrieben ist (Hokeness et al., 2005). In der Tat zeigten ELISA Zellkulturexperimente, dass die CCL2 Produktion strikt Typ 1 IFN abhängig ist und in IFNAR^{-/-} Makrophagen durch LPS nicht induzierbar war (siehe Abb. 3.25). Interessanterweise konnte durch IFN-β die LPS induzierte CCL2 Produktion in WT Makrophagen inhibiert werden. Einerseits kann CCL2 also durch LPS nur in Anwesenheit von IFNAR induziert werden, andererseits wird durch Co-Stimulation durch LPS und IFN-β die CCL2 Produktion deutlich inhibiert. Die Ergebnisse belegen, dass die Chemokinproduktion einer komplexen Regulation unterliegt und IFNAR wichtig für die LPS- abhängige CCL2 Induktion ist, aber auch unabhängig von IFNAR durch alternative Stimulatoren induziert werden kann. Um zu beantworten, auf welche Weise die höhere CCL2 und CXCL10 Expression durch das Fehlen des IFNAR zustande kam, wären weitere Experimente an verschiedenen Zelltypen wie Makrophagen, Mikroglia, Astrozyten u.a. sinnvoll. Hier könnte durch Stimulation mit verschiedenen Liganden die Regulation der Chemokine durch IFN-β auf verschiedenen Zelltypen aufgeklärt werden.

Die häufig in der Literatur verbreitete Th1/Th2 Hypothese zur Wirkung von IFN-β bei MS beschreibt die Veränderung des Th1/Th2 Zytokinmilieus zugunsten von Th2 (Krakauer et al., 2006). Die Theorie beschreibt eine Inhibition der Th1 Zytokine wie IL-12 und IFN-γ durch IFN-β und eine Induktion antiinflammatorischer Th2 Zytokine wie IL-4 und IL-10 (Wang et al., 2000). Auch in der EAE wird ein ähnlicher Wirkungsmechanismus des IFN-β beschrieben (Tuohy et al., 2000). Als Folge des veränderten Phänotyps der autoreaktiven T-Zellen soll so die Erkennung und Zerstörung der Oligodendrozyten durch T-Zellen verringert werden. Dabei ist kritisch anzumerken, dass durch die kürzlich entdeckten IL-17 produzierenden T-Zellen (Th17-Zellen) bei Mäusen und ihre herausragende Funktion bezüglich Autoimmunität (Bettelli et al., 2007) die Th1/Th2 Hypothese aus heutiger Sicht als unvollständig zu bewerten ist und um den besagten Zelltyp ergänzt werden muss. Zwar wurden bei Menschen bis heute noch keine enzephalitogenen Th17-Zellen in relevanten Mengen identifiziert, allerdings konnten in den Läsionen von MS Patienten hohe Expressionen von IL-17 (Lock et al., 2002) und IL-23 (Li et al., 2007) nachgewiesen werden, was auf einen ähnlichen pathologischen Mechanismus der Th17 Zytokine bei MS hinweist. Für die EAE sind eine Reihe von Faktoren bekannt, die die Ausdifferenzierung zu enzephalitogenen Th17-Zellen bedingt (Bettelli et al., 2006). Um zu überprüfen, ob der Typ 1 IFN Signalweg die Th1/Th2/Th17 Balance beeinflusst und so die unterschiedlichen, klinischen Symptome in WT und IFNAR^{-/-} Mäusen verursacht,

wurden mit ELISPOT Experimenten die Zahl von Th1, Th2 und Th17-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in Lymphknoten und im ZNS quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass durch das Fehlen des IFNAR das Verhältnis und die Zahl der verschiedenen T-Zellpopulationen unverändert blieb. Überdies wurden in den präklinischen, akuten und chronischen Phasen der EAE im ZNS von WT und IFNAR^{-/-} Mäusen eine gleiche Expression von Th1, Th2 und Th17 Genen gemessen (3.2.4). Damit sprechen die Ergebnisse gegen die Hypothese, dass Typ 1 IFN die Th1/Th2 Balance (bzw. Th1/Th2/Th17 Balance) beeinflussen. Die zur Literatur beschriebenen Effekte des IFN- β auf die Th1/Th2 Balance könnte damit erklärbar sein, dass viele Arbeiten die Wirkung von IFN- β auf verschiedene Zelltypen nur *in vitro* unter spezifischen Bedingungen untersuchten. Die Wirkung von Typ 1 IFN sind aber höchst pleiotrop und können, abhängig vom Zytokinmilieu oder Entwicklungsstadium eines Zelltyps, gegensätzliche Funktionen haben wie z.B. die Unterstützung (Luft et al., 1998) oder Inhibition (Dauer et al., 2003) der Reifung dendritischer Zellen. Entsprechend unterschiedlich können Typ 1 IFN auch auf T-Zellen wirken (Bogdan, 2000). Ein weiterer Grund für die abweichenden Ergebnisse zwischen Literatur und den hier beschriebenen Ergebnissen der Typ 1 IFN auf die T-Zell Funktion *in vivo* können damit zusammenhängen, dass in dieser Arbeit auf die Rolle des endogenen, krankheitsassoziierten Typ 1 IFN fokussiert wurde, und nicht auf rekombinantes, exogenes Typ 1 IFN.

Es folgte schließlich ein adoptiver Transfer von MOG₃₅₋₅₅-spezifischen, enzephalitogenen WT T-Zellen in WT und IFNAR^{-/-} Mäuse (passive EAE). Ein Vorteil der passiven EAE ist, dass die Entzündung unabhängig von der Immunisierung abläuft und auf diese Weise ausgeschlossen werden kann, dass die unterschiedlichen Symptome zwischen WT und IFNAR^{-/-} Mäusen durch Bestandteile des Inokulums ausgelöst wurden. Denkbare wäre z.B., dass die im Kompletten Freundschens Adjuvans enthaltenen, hitzeinaktivierten *M. tuberculosis* Bakterien zur Induktion von Typ 1 IFN führten. Diese endogene Typ 1 IFN Produktion hätte möglicherweise einen schützenden Effekt für den Verlauf der EAE gehabt. Ein weiterer Vorteil der passiven EAE ist, dass die Reifung und Expansion der T-Zellen (*priming*) bereits in den Spendertieren erfolgte. Die EAE verläuft in der passiven EAE also unabhängig vom T-Zellpriming. Wie in 3.2.5 dargestellt, entwickelten die IFNAR^{-/-} Mäuse auch hier deutlich schwerere Symptome. Die Ergebnisse zeigen, dass der immunmodulatorische Einfluss des IFNAR auf die EAE unabhängig von der Immunisierung und dem T-Zellpriming in der Peripherie ist. Die schützende Funktion des IFNAR in den WT Mäusen scheint vielmehr in der Effektorphase vermittelt zu werden.

4.2.2 Zellspezifische Funktionen des Typ 1 IFN Systems

Zur Identifizierung des Zell- oder Gewebetyps, der die schützende Funktion des IFNAR für die EAE bedingt, wurde der Rezeptor mit Hilfe des Cre-loxP Systems zellspezifisch deletiert. Southern Blot Analysen von DNA Proben aus verschiedenen Zelltypen und Geweben zeigten, dass das Exon10 des IFNAR 1, welches für den lipophilen, transmembranen Teil des IFNAR 1 codiert, im ZNS, Makrophagen, sowie T und B-Zellen in den jeweiligen Mauslinien spezifisch deletiert wurde (3.3.1). Entsprechend war der IFNAR auf der Zelloberfläche von B-Zellen (IFNAR^{fl/fl} CD19Cre) und T-Zellen (IFNAR^{fl/fl} CD4Cre) nicht mehr nachweisbar (3.3.2). Im Blut von IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen hingegen zeigte sich, dass eine Population von CD11b⁺ Zellen weiterhin IFNAR exprimiert. Zwar wird CD11b als Marker für Makrophagen eingesetzt, allerdings exprimieren neben Makrophagen auch Granulozyten, dendritische Zellen und im geringeren Maße NK Zellen CD11b (Springer et al., 1978). Überdies stellen auch Makrophagen eine heterogene Zellpopulation dar, die sich im Blut in mindestens zwei Populationen, residente und inflammatorische Monozyten, unterscheiden lassen (Geismann et al., 2003). Die Deletionseffizienz durch LysMCre ist in dendritischen Zellen sehr gering und auch in Makrophagen nicht vollständig (Claussen et al., 1999), was die Expression des IFNAR auf einigen CD11b positiven Zellen im Blut erklären könnte. Da der IFNAR Antikörper für FACS-Analysen nicht kommerziell erhältlich ist und nur begrenzt zur Verfügung stand, mussten von weiteren, differenziellen Analysen der Makrophagensubpopulationen abgesehen werden.

Da der Wirkungsmechanismus von IFN- β bei der MS unklar ist und IFNAR ubiquitär exprimiert wird, wurde die Funktion des IFNAR auf **Zellen neuroektodermalen Ursprungs** während der EAE untersucht. Dazu wurden EAE Experimente an IFNAR^{fl/fl} NestinCre Mäusen durchgeführt, bei denen der IFNAR spezifisch auf Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten deletiert war. Es zeigte sich, dass das Fehlen des IFNAR auf den oben genannten glialen und neuronalen Zellen den Krankheitsverlauf nicht beeinflusste (3.4.1). Die schützende Funktion des endogenen IFN- β kann somit nicht an Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten festgemacht werden. Dies ist insofern bemerkenswert, da in der Vergangenheit häufig versucht wurde, IFN- β spezifische Effekte auf Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten nachzuweisen. So konnte an Astrozyten gezeigt werden, dass IFN- β die NO-Synthese inhibiert (Stewart et al., 1997) oder die IL6 Produktion verstärkt (Okada et al., 2005). Auch wurden neuroprotektive Effekte wie die Induktion von Wachstumsfaktoren in Astrozyten durch

IFN- β beobachtet (Boutros et al., 1997). Weitere Arbeiten sahen einen Zusammenhang zwischen IFN- β und der Reifung von Oligodendrozyten (Mastrodardi et al., 2004; Heine et al., 2006). Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die schützende Wirkung zumindest partiell auf eine direkte Wirkung des IFN- β auf Astrozyten und Oligodendrozyten zurückzuführen ist. Zwar scheint es verschiedenste Einflüsse des IFN- β auf gliale und neuronale Zellen zu geben, diese sind allerdings nach den hier dargestellten Ergebnissen für die ZNS Autoimmunität *in vivo* nicht entscheidend. Die biologische Funktion der Typ 1 IFN auf Zellen neuroektodermalen Ursprungs könnte vielmehr in der angeborenen Immunabwehr begründet sein, welche essentiell ist bei viralen Infektionen im ZNS (Griffin 2003). Besonders eindrucksvoll zeigte sich die hirnspezifische Funktion des IFNAR durch Experimente an IFNAR^{fl/fl} NestinCre Mäusen, welche im Gegensatz zu WT Mäusen nach einer VSV Infektion die virale Replikation im Gehirn nicht mehr eindämmen konnten und an der Infektion verstarben (U. Kalinke, persönliche Mitteilung).

Es folgte die Untersuchung der Rolle des IFNAR auf **T-Zellen**. Zwar zeigten die Experimente an IFNAR^{-/-} Mäusen, dass die Th1/Th2 und Th17 Expressionsprofile und das Verhältnis der verschiedenen T-Effektorzellen durch das Fehlen des IFNAR nicht beeinflusst wurde, jedoch war nicht auszuschließen, dass durch den IFNAR Funktionen wie die Proliferation, Zytokinproduktion oder die Reaktivierung der T-Zellen reguliert wurde. Durch EAE Experimente an IFNAR^{fl/fl} CD4Cre Mäusen, in denen der IFNAR spezifisch in T-Zellen deletiert ist, sollte die Funktion des IFNAR auf T-Zellen geklärt werden. Auch hier konnten keine Unterschiede im klinischen Verlauf der EAE beobachtet werden, d.h. die immunmodulatorische Funktion des IFNAR in WT Mäusen wurde nicht über T-Zellen vermittelt. Da als Wirkungsmechanismen des IFN- β die Inhibition der T-Zellproliferation und Modulation der Zytokinproduktion diskutiert werden (Noronha et al., 1993; Rep et al., 1996), wurde die Antigen-abhängige Proliferation und IL-17 Produktion von Lymphozyten aus IFNAR^{fl/fl} CD4Cre und WT Mäusen gemessen (3.5.3). Auch hier konnten keine Unterschiede festgestellt werden, der IFNAR auf T-Zellen hatte also keinen Einfluss auf ihr *priming*. In der Effektorphase der EAE war der Aktivierungsstatus der infiltrierenden T-Zellen, ermittelt durch CD44 und CD62L FACS-Analysen, in IFNAR^{fl/fl} CD4Cre und Kontrolltieren ebenfalls gleich (3.5.4). Die Ergebnisse zeigen, dass das IFNAR-Signaling auf T-Zellen keine ihrer krankheitsrelevanten Funktionen veränderte.

Bei MS Patienten sind allerdings auch CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten in den Läsionen zu finden (Babbe et al., 2000), denen neben den CD4⁺ Th1-Zellen ebenfalls

pathologische Funktionen zugeschrieben werden (Neumann et al., 2002). CD8⁺ T-Zellen sind in dem hier verwendeten EAE Modell an der Pathogenese nicht beteiligt und eine mögliche Funktion des IFNAR für diesen Zelltyp kann nicht ausgeschlossen werden. Die Induktion einer CD8⁺ T-Zell-vermittelten EAE (Sun et al., 2001) in entsprechenden Knockout Mäusen könnte hier die Funktion des IFNAR für CD8⁺ T-Zellen klären. Zumindest bei viralen Infektionen konnte bereits eine wichtige Funktion des IFNAR auf CD8⁺ T-Zellen eindrucksvoll gezeigt werden (Le Bon et al., 2006a).

Die Rolle der **B-Zellen** und myelinspezifischer Autoantikörper in der Pathogenese der MS ist derzeit noch umstritten und nicht völlig verstanden (Gold et al., 2006). Im ZNS von MS Patienten wurden zwar myelinspezifische Autoantikörper gefunden (Raine et al., 1999) und es wird eine pathologische Funktion dieser Antikörper diskutiert (Noseworthy et al., 2000), allerdings scheint die IFN- β Therapie das Auftreten der myelinspezifischen Antikörper nicht zu beeinflussen (Angelucci et al., 2005). Dennoch wurde mit B-zellspezifischen IFNAR^{-/-} Mäusen (IFNAR^{fl/fl} CD19Cre) ein möglicher Zusammenhang zwischen IFNAR auf B-Zellen und den klinischen Symptomen überprüft. Dies erschien deshalb notwendig, da in der EAE die Remission der klinischen Symptome von IL-10 produzierenden B-Zellen unterstützt wird (Fillatreau et al., 2002) und IFNAR^{-/-} Mäuse nach der akuten Phase nicht remittierten. Außerdem konnten im Serum von IFN- β behandelten MS Patienten erhöhte IL-10 Konzentrationen gemessen werden (Ersoy et al., 2005; Bartosik-Psujek und Stelmasiak, 2006). Wie unter 3.6.1 beschrieben, zeigten die IFNAR^{fl/fl} CD19Cre Mäuse und Kontrolltiere keine klinischen Unterschiede. Experimente an B-Zellen aus immunisierten Mäusen bestätigten, dass die Ag-abhängige Produktion des IL-10 von B-Zellen durch IFNAR nicht beeinflusst wurde. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die regulatorische Funktion der B-Zellen, vermittelt durch IL-10, unabhängig vom Typ 1 IFN System ist und nicht den schützenden Effekt des IFNAR während der EAE erklärt. Auch hier muss angemerkt werden, dass die EAE nur die Th1/Th17 Autoimmunantwort der MS darstellt und die B-Zell-Abhängigkeit gering ist, wenn von der regulatorischen Eigenschaft der B-Zellen abgesehen wird. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei einer B-Zell vermittelten ZNS Autoimmunität möglicherweise doch durch Typ 1 IFN die Immunantwort moduliert wird. Bei Infektionen ist ein Zusammenhang zwischen IFNAR und des IgM/IGM Klassenwechsels bekannt (Le Bon et al., 2006b). Durch B-Zell abhängige EAE Modelle (Kuerten et al., 2006) könnte hier die Funktion des IFNAR auf B-Zellen in der ZNS Autoimmunität restlos aufgeklärt werden.

Da **Makrophagen** maßgeblich an der Zerstörung der Myelinschicht und Axone beteiligt sind und in großer Zahl in den Läsionen vorkommen (Noseworthy et al., 2000), wurde an IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen die Rolle des IFNAR auf myeloischen Zellen untersucht. Wie unter 3.7.1 dargestellt, entwickelten IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäuse signifikant schwerere EAE Symptome als die Kontrolltiere. Im ZNS konnten eine gesteigerte Expression von TNF- α und CCL2, sowie Makrophagen und Mikroglia mit erhöhter MHCII Expression nachgewiesen werden. Unterstützend konnte *in vitro* eine Regulation der Zytokin- und Chemokinproduktion und der Myelinphagozytose durch IFNAR beobachtet werden. Es stellte sich die Frage, welcher der verschiedenen myeloischen Zelltypen (Granulozyten, Makrophagen, Mikroglia) durch IFNAR reguliert wird und die Pathogenese der EAE bestimmt. Da auch Granulozyten in IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen IFNAR deletiert sind und regulatorische Funktionen in der EAE haben (Zehntner et al., 2005), wurden in IFNAR^{-/-} Mäusen die zeitabhängige Infiltration der Granulozyten in der präklinischen und frühen Phase der EAE histologisch untersucht (nicht gezeigt). Ihre Zahl war in IFNAR^{-/-} und WT Mäusen gleich hoch und nahm in der chronischen Phase in beiden Gruppen gleichmäßig ab. IFNAR scheint also die Infiltration der Granulozyten nicht zu beeinflussen. In der chronischen Phase war die Zahl der infiltrierenden Makrophagen hingegen im ZNS der IFNAR^{-/-} Mäuse signifikant erhöht, und die infiltrierenden Makrophagen und Mikroglia der IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäuse zeigten eine gesteigerte MHCII Expression. Da die Antigenerkennung der CD4⁺ T-Zellen über MHCII Moleküle erfolgt, könnte ihre erhöhte Expression auf myeloischen Zellen eine Ursache für die starken EAE Symptome sein. Unterstützung findet dies durch Arbeiten an MHCII deletierten Mäusen, in denen EAE nicht induzierbar ist. Durch spezifische Expression des MHCII in dendritischen Zellen entwickelten die Tiere wieder die gleichen Symptome wie die Kontrolltiere (Greter et al., 2005). Ferner konnten durch pharmakologische Inhibition der MHCII Moleküle die EAE Symptome vermindert werden (Nikodemova et al., 2007). Möglicherweise findet in den IFNAR^{-/-} Mäusen durch eine höhere MHCII Expression in myeloischen Zellen eine verstärkte Antigenpräsentation statt, die eine vermehrte Reaktivierung von T-Zellen und eine Verstärkung der Entzündung zur Folge hat. Das *priming* der T-Zellen in den Lymphknoten wurde jedoch durch die Deletion des IFNAR auf myeloischen Zellen nicht beeinflusst, was die Restimulationsexperimente klar belegten (siehe 3.7.6). Die Modulation der EAE durch den IFNAR erfolgte also erst in der Effektorphase der EAE und direkt im ZNS.

Durch eine spezifische Deletion des IFNAR auf peripheren Makrophagen oder Mikroglia könnte festgestellt werden, ob Makrophagen und Mikroglia gleichermaßen durch IFNAR reguliert werden. Zu Erreichen wäre dies durch die Bestrahlung von

IFNAR^{fl/fl} LysMCre Mäusen und Rekonstitution mit WT Knochenmark. In diesen Mäusen wäre der IFNAR spezifisch in den strahlungsresistenten Mikroglia deletiert. WT Mäuse, rekonstituiert mit IFNAR^{fl/fl} LysMCre Knochenmark hätten hingegen ausschließlich eine Deletion des IFNAR in peripheren Makrophagen. Auf ähnliche Weise konnte bereits der Beitrag der aktivierten Mikroglia an der Pathogenese der EAE gezeigt werden (Heppner et al., 2005).

4.2.3 Hypothese zur Funktionsweise des IFNAR während der EAE und molekulare Mechanismen

Die in 4.2.2 diskutierten Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss des IFNAR auf den klinischen Verlauf der EAE und zeigten, dass seine regulatorische Wirkung über infiltrierende Makrophagen und Mikroglia vermittelt wurde. Basierend auf den in dieser Arbeit beschriebenen Resultaten und der Literatur soll im folgenden ein Modell über die Wirkungsweise des endogenen Typ 1 IFN Systems bei der ZNS Autoimmunität entworfen werden.

In der ersten Phase (*priming* Phase, Abb. 4.1 A) der Autoimmunreaktion, unmittelbar nach der Immunisierung der Mäuse mit MOG₃₅₋₅₅ in CFA, erfolgt zunächst die Phagozytose des MOG Peptids durch antigenpräsentierende Zellen (APC). Naive, MOG-spezifische CD4⁺ T-Zellen erkennen über die APC das MOG Peptid und reifen in den Lymphknoten zu aktivierten, MOG-spezifischen T-Zellen heran. Die Aktivierung und klonale Expansion der T-Zellen wird durch das komplette Freundesche Adjuvans unterstützt, welches *M. tuberculosis*-Antigene enthält und potentiell über *toll-like* Rezeptoren wie TLR4 und TLR9 Typ 1 IFN induzieren kann. Trotzdem hat in dieser Phase der IFNAR noch keine modulatorische Wirkung auf die ablaufende T-Zell Aktivierung und klonale Expansion. In der zweiten Phase (Akute Phase Abb. 4.1 B) kommt es zur Infiltration des ZNS durch aktivierte Th1- und Th17-Zellen, wo sie durch myeloische dendritische Zellen (mDC) reaktiviert werden und eine Entzündungskaskade auslösen, die eine Rekrutierung von Makrophagen und Granulozyten in das ZNS zur Folge hat. Die autoreaktiven Th1- und Th17-Zellen aktivieren Effektorfunktionen von Astrozyten, infiltrierenden Makrophagen und Mikroglia, die sich gegen die Markscheiden und Oligodendrozyten richten. Die Makrophagen und Mikroglia schütten als Folge ihrer Aktivierung chemotaktische Proteine und Zytokine aus und locken damit weitere Leukozyten in das entzündete Gewebe. Im Zuge des Entzündungsprozesses kommt es zur Produktion von IFN- β , welches möglicherweise durch die Stimulierung von plasmazytoiden DC durch endogene TLR-Liganden hervorgerufen wird. Das Expressionsprofil der

chemotaktischen Proteine in den Makrophagen und Mikroglia wird dabei durch das endogene IFN- β reguliert, wobei es in erster Linie zur Limitierung ihrer Expression kommt. Fehlt der IFNAR auf den myeloischen Zellen, so findet keine negative Regulation der proinflammatorischen Chemokine statt und es kommt zu einer verstärkten Migration von weiteren Makrophagen in das entzündete Gewebe.

Ein weiterer Faktor, der entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der EAE einnimmt, ist die Expression von MHC Klasse II Molekülen. Sowohl Makrophagen als auch Mikroglia sind an der Präsentation von Antigenen beteiligt, welche den CD4⁺ T-Zellen über MHCII Moleküle präsentiert werden. Die MHCII Expression wird ebenfalls durch IFN- β reguliert und ist durch das Fehlen des IFNAR auf Makrophagen und Mikroglia stark erhöht. Ebenso findet durch das Fehlen des IFNAR eine gesteigerte Myelinphagozytose statt. Durch die erhöhte MHCII Expression und gesteigerten Myelinphagozytose kommt es zu einer verstärkten Antigenpräsentation, die eine höhere Reaktivierung von T-Zellen zur Folge hat. Möglicherweise begünstigt die erhöhte MHCII Expression sogar die Aktivierung von T-Zellen, die spezifisch sind für weitere Myelinantigene wie MBP und PLP („*epitope spreading*“). Das Fehlen des IFNAR auf Astrozyten, welche ebenfalls an der Chemotaxis und der Zytokinproduktion beteiligt sind, scheint hingegen keine Konsequenzen für die Entzündung zu haben. Ähnliches gilt für Oligodendrozyten und Neurone: Das bei viralen Infektionen schützende Typ 1 IFN System hat auf diese Zellen in der Autoimmunität keine Wirkung; Das Ausmaß der axonalen Schädigung und Demyelinisierung hängt nicht von der IFNAR Expression auf Neuronen und Oligodendrozyten ab.

In einer dritten, remittierenden Phase (Abb. 4.1 C) kommt es zu einer negativen Regulation der inflammatorischen Zytokine und Chemokine und einer Induktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β 1. Als Folge tritt eine sukzessive Verbesserung der klinischen Symptome ein. Ohne ein funktionierendes Typ 1 IFN System jedoch ist die axonalen Schädigung und Demyelinisierung erheblich verstärkt, so dass eine Verbesserung der klinischen Symptome ausbleibt.

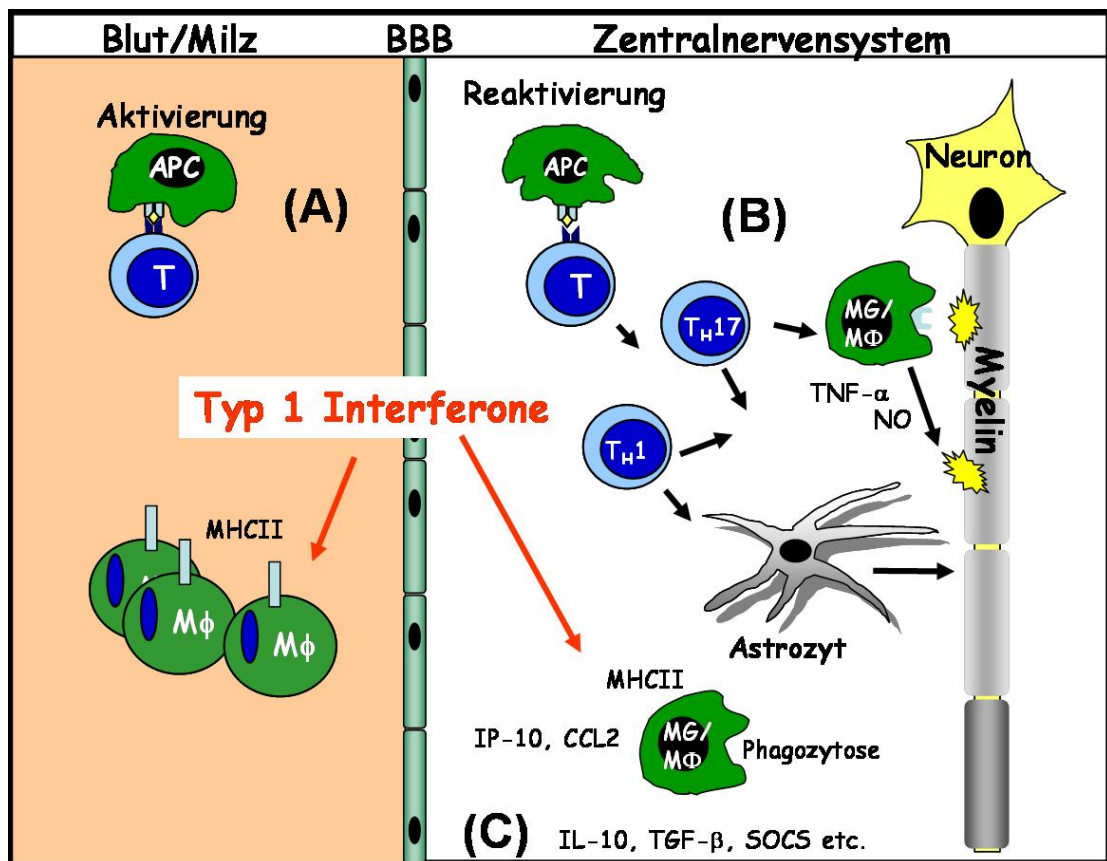


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des hypothetischen Wirkungsmechanismus der Typ 1 IFN in der ZNS Autoimmunität. (A) *Priming* Phase. (B) Akute Phase (C) Remittierende Phase. Antigen-präsentierende Zelle (APC). Blut-Hirn-Schranke (BBB) Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHCII). Makrophage (MΦ). Mikroglia (MG). Stickstoffmonoxid (NO). *Suppressor of cytokine signalling* (SOCS)

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die multiple Sklerose (MS) wird als eine inflammatorische, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) angesehen, dessen Ätiologie derzeit unklar ist. Es wird angenommen, dass die Pathogenese einer zellulär vermittelten Autoimmunität unterliegt, was durch die Entdeckung inflammatorischer Infiltrate in den MS Läsionen der weißen Substanz des ZNS unterstützt wird. Eine zentrale Behandlungsmethode der Erkrankung stellt die Verabreichung des Typ 1 Interferons Interferon- β (IFN- β) dar, welches die Schubrate um ca. 35 % reduziert und das Fortschreiten der Behinderungen bei schubförmig-remittierender MS verzögert. Die Wirksamkeit lässt allerdings in bis zu 30 % aller Fälle innerhalb eines Jahres nach, was bei vielen Patienten auf die Bildung von Autoantikörpern gegen IFN- β zurückgeführt wird. Außerdem wird bei einem erheblichen Teil von Patienten die IFN- β Therapie aufgrund schwerer Nebenwirkungen wie Hautreizungen, Fieber, Leukozytopenie und Depressionen abgebrochen. Diese ungünstigen Effekte unterstreichen die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses der Wirkung von IFN- β auf molekularer und zellulärer Ebene *in vivo*. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), ein Tiermodell der MS, ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Untersuchung neuroimmunologischer Vorgänge, die der menschlichen Erkrankung ähneln. Die vorliegende Arbeit sollte zu einem besseren Verständnis der Wirkung von Typ1 IFN in der ZNS-Autoimmunität beitragen. Mit konditionalen Typ 1 IFN Rezeptor (IFNAR) „knockout“ Mäusen sollte außerdem der entscheidende Zelltyp identifiziert werden, über den die Modulation der Entzündung durch die Typ 1 IFN vermittelt wird.

Untersuchungen an EAE erkrankten Mäusen zeigten eine endogene, auf das ZNS beschränkte IFN- β Produktion, die eine schützende Funktion auf die Effektorphase der EAE hatte. Durch das Fehlen des IFNAR konnte diese schützende Funktion aufgehoben werden: Die Tiere entwickelten schwerere klinische EAE Symptome. Gleichzeitig führte das Fehlen des IFNAR zu einem veränderten Entzündungsmuster im ZNS, was sich durch eine erhöhte Infiltration von Makrophagen und einer höheren Demyelinisierung der weißen Substanz äußerte. Ferner kam es in IFNAR^{-/-} Mäusen zu einer stärkeren Genexpression von Chemokinen, die chemotaktisch auf Leukozyten wirken. Entgegen älterer Studien konnte widerlegt werden, dass die schützende Funktion der Typ 1 IFN über Zellen neuroektodermalen Ursprungs wie Astrozyten, Oligodendrozyten oder Neurone vermittelt wird. Ebenso hatte der IFNAR auf T und B-Zellen keinen schützenden Effekt. Indes führte das alleinige Fehlen des IFNAR auf myeloischen Zellen zu einer signifikanten Verschlechterung der Erkrankung in der

Effektorphase. Die IFNAR deletierten, myeloischen Zellen zeigten eine erhöhte MHCII Expression *in vivo* und ein verändertes Chemokinprofil, was auf eine Überaktivierung dieses Zelltyps hinweist. Darüberhinaus zeigten Zellkulturexperimente eine regulatorische Funktion von IFN- β auf die Myelinphagozytose von Makrophagen.

Die Ergebnisse verdeutlichen eine neuartige Funktion der Typ1 IFN in der Effektorphase der EAE, in der IFN- β auf Makrophagen wirkt und zu einer Reduktion der autoimmunen Entzündung führt. Durch die Erkenntnisse dieser Arbeit können möglicherweise neue Wege für zellspezifische, auf IFN- β basierende Therapien gefunden werden, die schwere Nebenwirkungen vermindern.

6. SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is considered to be an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS), the etiology of which remains unclear. It is generally held that cell-mediated autoimmunity underlies the pathogenesis based on the identification of inflammatory infiltrates in MS lesions of the CNS white matter. One pivotal method of treatment of the disease is the application of the type 1 interferon interferon- β (IFN- β), which reduces frequency of clinical exacerbations by about 35 % and delays the progression of disability in relapsing-remitting MS. However, in up to one third of the cases the efficacy of IFN- β therapy ceases after one year, partly due to the fact that many of these patients developed autoantibodies against IFN- β . Furthermore, a substantial proportion of the patients discontinued IFN- β treatment because of multiple serious side effects, such as skin reactions, flue-like symptoms, leukocytopenia and depression. These adverse effects stress the need to better understand how IFN- β actually functions on the molecular and cellular levels in an *in vivo* setting. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of MS, is a vital tool to study the neuroimmunological events related to the disease. The present work should contribute to a better understanding how type 1 IFN work in ZNS autoimmunity. Conditionally deleted IFNAR mice were used to identify the actual cell type targeted by disease-associated IFN- β .

Examinations on EAE diseased mice demonstrated an endogenous, ZNS restricted IFN- β production, which had protective functions in the effectorphase during EAE. Absence of IFNAR abolished these protective functions: The animals developed more severe EAE symptoms. Concomitantly, the lack of IFNAR resulted in an altered inflammatory pattern, characterized by a higher infiltration of macrophages and a higher demyelination of the white matter in the CNS. Also the expression of chemokines that are known to be potent chemoattractants for leukocytes were enhanced in IFNAR^{-/-} mice. Contrary to prior studies, a protective function of the Type1 IFN for cells of neuroectodermal origin, namely astrocytes, oligodendrocytes or neurons could be disproved. Similarly, the engagement of IFNAR on T cells had no protective effect. In contrast, absence of IFNAR on myeloid cells led to severe disease with an enhanced effector phase. IFNAR deleted myeloid cells showed excessive MHC class II molecule expression *in vivo* and an altered release of proinflammatory cytokines, indicating an overactivation of this cell type. Moreover, cell culture experiments showed a regulatory role for type 1 IFN on myelinphagocytosis of macrophages.

These results provide a new function of type 1 IFN in the effectorphase of EAE by IFN- β targeting myeloid cells that reduced autoimmune inflammation. These data may open new avenues to more cell-specific IFN- β -based therapies minimizing severe side effects.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Allavena P, Giardino G, Sen S, Colella G, Broggin M, D'Incalci M (1998) IFN-beta partially counteracts inhibition of natural killer activity induced by some antitumor agents. *J Interferon Cytokine Res* 18:87-93.

Angelucci F, Mirabella M, Frisullo G, Caggiula M, Tonali PA, Batocchi AP (2005) Serum levels of anti-myelin antibodies in relapsing-remitting multiple sclerosis patients during different phases of disease activity and immunomodulatory therapy. *Dis Markers* 21:49-55.

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K (2000) Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192:393-404.

Baccala R, Kono DH, Theofilopoulos AN (2005) Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity. *Immunol Rev* 204:9-26.

Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD (2007) CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol* 8:172-180.

Bartholome EJ, Willems F, Crusiaux A, Thielemans K, Schandene L, Goldman M (1999) IFN-beta interferes with the differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells: selective inhibition of CD40-dependent interleukin-12 secretion. *J Interferon Cytokine Res* 19:471-478.

Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z (2006) The interleukin-10 levels as a potential indicator of positive response to interferon beta treatment of multiple sclerosis patients. *Clin Neurol Neurosurg* 108:644-647.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.

Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2007) T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8:345-350.

-
- Billadeau DD, Nolz JC, Gomez TS** (2007) Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* 7:131-143.
- Bogdan C** (2000) The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol* 12:419-424.
- Bogdan C, Mattner J, Schleicher U** (2004) The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol Rev* 202:33-48.
- Boutros T, Croze E, Yong VW** (1997) Interferon-beta is a potent promoter of nerve growth factor production by astrocytes. *J Neurochem* 69:939-946.
- Boven LA, Van MM, Van ZM, Wierenga-Wolf A, Hintzen RQ, Boot RG, Aerts JM, Amor S, Nieuwenhuis EE, Laman JD** (2006) Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain* 129:517-526.
- Braun D, Geraldles P, Demengeot J** (2003) Type I Interferon controls the onset and severity of autoimmune manifestations in *lpr* mice. *J Autoimmun* 20:15-25.
- Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein W, Churakovsa T, Low J, Presta L, Hunter CA, Kastelein RA, Cua DJ** (2006) Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 116:1317-1326.
- Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I** (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using *LysMcre* mice. *Transgenic Res* 8:265-277.
- Correale J, Villa A** (2007) The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity* 40:148-160.
- Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, Stastny P, Douek DC, Koup RA, Rucke MK, Karandikar NJ** (2004) High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* 103:4222-4231.
- Crocker PR, Jefferies WA, Clark SJ, Chung LP, Gordon S** (1987) Species heterogeneity in macrophage expression of the CD4 antigen. *J Exp Med* 166:613-618.

Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, Lewis C, sselin-Paturel C, Briere F, Trinchieri G, Biron CA (2002) Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* 195:517-528.

Dauer M, Pohl K, Obermaier B, Meskendahl T, Robe J, Schnurr M, Endres S, Eigler A (2003) Interferon-alpha disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon-alpha-treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation. *Immunology* 110:38-47.

Delhaye S, Paul S, Blakqori 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.

Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET (2003) Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin Pathol* 3:3.

Dumont FJ (2002) IDEC-131. IDEC/Eisai. *Curr Opin Investig Drugs* 3:725-734.

Ersoy E, Kus CN, Sener U, Coker I, Zorlu Y (2005) The effects of interferon-beta on interleukin-10 in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 12:208-211.

Ewel CH, Sobel DO, Zeligs BJ, Bellanti JA (1992) Poly I:C accelerates development of diabetes mellitus in diabetes-prone BB rat. *Diabetes* 41:1016-1021.

Fabris P, Floreani A, Tositti G, Vergani D, De Lalla F, Betterle C (2003) Type 1 diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C before and after interferon therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 18:549-558.

Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM (2002) B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3:944-950.

Floris S, Ruuls SR, Wierinckx A, van der Pol SM, Dopp E, van der Meide PH, Dijkstra CD, De Vries HE (2002) Interferon-beta directly influences monocyte infiltration into the central nervous system. *J Neuroimmunol* 127:69-79.

Friese MA, Montalban X, Willcox N, Bell JI, Martin R, Fugger L (2006) The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain* 129:1940-1952.

Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354:942-955.

Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82.

Gold R, Linington C, 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* 129:1953-1971.

Graham RR, et al. (2007) Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6758-6763.

Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B (2005) Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 11:328-334.

Griffin DE (2003) Immune responses to RNA-virus infections of the CNS. *Nat Rev Immunol* 3:493-502.

Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265:103-106.

Guerci AP, Guerci B, Levy-Marchal C, Ongagna J, Ziegler O, Candiloros H, Guerci O, Drouin P (1994) Onset of insulin-dependent diabetes mellitus after interferon-alfa therapy for hairy cell leukaemia. *Lancet* 343:1167-1168.

Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H (2000) Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 192:595-600.

Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De JP, Baecher-Allan C (2005) Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 204:208-231.

Hardy MP, Owczarek CM, Jermiin LS, Ejdeback M, Hertzog PJ (2004) Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics* 84:331-345.

Heine S, Ebnet J, Maysami S, Stangel M (2006) Effects of interferon-beta on oligodendroglial cells. *J Neuroimmunol* 177:173-180.

Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hovelmeyer N, Waisman A, Rulicke T, Prinz M, Priller J, Becher B, Aguzzi A (2005) Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 11:146-152.

Hokeness KL, Kuziel WA, Biron CA, Salazar-Mather TP (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *J Immunol* 174:1549-1556.

Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Stahl NI, Decker JL, Notkins AL (1979) Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med* 301:5-8.

Honda K, Takaoka A, Taniguchi T (2006) Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25:349-360.

Hron JD, Peng SL (2004) Type I IFN protects against murine lupus. *J Immunol* 173:2134-2142.

Huang X, Yuang J, Goddard A, Foulis A, James RF, Lernmark A, Pujol-Borrell R, Rabinovitch A, Somoza N, Stewart TA (1995) Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes* 44:658-664.

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

Ito K, Bian HJ, Molina M, Han J, Magram J, Saar E, Belunis C, Bolin DR, Arceo R, Campbell R, Falcioni F, Vidovic D, Hammer J, Nagy ZA (1996) HLA-DR4-IE chimeric class II transgenic, murine class II-deficient mice are susceptible to experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 183:2635-2644.

Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W, Liu YJ (2006) Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 107:2423-2431.

Kabat EA, Glusman M, Knaub V (1948). Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *Am. J. Med.* 4:653-662

Kabat EA, Wolf A, Bezer AE, Murray JP (1951) Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J Exp Med* 93:615-633.

Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, Haas T, Korn AA, Karlsson G, Radue EW (2006) Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 355:1124-1140.

Kato T, Kitaura M, Inaba K, Watanabe Y, Kawade Y, Muramatsu S (1992) Suppression of macrophage Ia antigen expression by endogenous interferon-alpha/beta. *J Interferon Res Spec No*:29-41.

Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:566-573.

Krakauer M, Sorensen PS, Khademi M, Olsson T, Sellebjerg F (2006) Dynamic T-lymphocyte chemokine receptor expression induced by interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 64:155-163.

Krakowski M, Owens T (1996) Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 26:1641-1646.

Kuerten S, Lichtenegger FS, Faas S, Angelov DN, Tary-Lehmann M, Lehmann PV (2006) MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 177:99-111.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.

Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF (2007) The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 17:210-218.

Lassmann H, Raine CS, Antel J, Prineas JW (1998) Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunol* 86:213-217.

Le BA, Durand V, Kamphuis E, Thompson C, Bulfone-Paus S, Rossmann C, Kalinke U, Tough DF (2006a) Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *J Immunol* 176:4682-4689.

Le BA, Thompson C, Kamphuis E, Durand V, Rossmann C, Kalinke U, Tough DF (2006b) Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. *J Immunol* 176:2074-2078.

Lee JM, Olitsky PK (1955) Simple method for enhancing development of acute disseminated encephalomyelitis in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 89:263-266.

Lee PP, Fitzpatrick DR, Beard C, Jessup HK, Lehar S, Makar KW, Perez-Melgosa M, Sweetser MT, Schlissel MS, Nguyen S, Cherry SR, Tsai JH, Tucker SM, Weaver WM, Kelso A, Jaenisch R, Wilson CB (2001) A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15:763-774.

Li Q, Milo R, Panitch H, Bever CT, Jr. (1998) Effect of propranolol and IFN-beta on the induction of MHC class II expression and cytokine production by IFN-gamma IN THP-1 human monocytic cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20:39-61.

Li Y, Chu N, Hu A, Gran B, Rostami A, Zhang GX (2007) Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain* 130:490-501.

Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L (2002) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8:500-508.

Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J, Perrin PJ, June CH, Racke MK (1998) Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. *J Clin Invest* 101:725-730.

Luca ME, Visser L, Lucas CJ, Nagelkerken L (1999) IFN-beta modulates specific T cell responses in vitro but does not affect Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the SJL mouse. *J Neuroimmunol* 100:190-196.

Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H (1996) Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6:259-274.

Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J (1998) Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* 161:1947-1953.

Luster AD, Alon R, von Andrian UH (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6:1182-1190.

Mantovani A, Bonecchi R, Locati M (2006) Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* 6:907-918.

Martin-Saavedra FM, Flores N, Dorado B, Eguiluz C, Bravo B, Garcia-Merino A, Ballester S (2007) Beta-interferon unbalances the peripheral T cell proinflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol* 44:3597-3607.

Mastronardi FG, Min W, Wang H, Winer S, Dosch M, Boggs JM, Moscarello MA (2004) Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis and nonimmune demyelination by IFN-beta plus vitamin B12: treatment to modify notch-1/sonic hedgehog balance. *J Immunol* 172:6418-6426.

Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG (2004) Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427:355-360.

Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, Willmer-Hulme AJ, Dalton CM, Miszkiel KA, O'Connor PW (2003) A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 348:15-23.

Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264:1918-1921.

Murray PJ (2007) The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178:2623-2629.

Nagata S, Taira H, Hall A, Johnsrud L, Streuli M, Ecsodi J, Boll W, Cantell K, Weissmann C (1980) Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* 284:316-320.

-
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H** (2002) Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci* 25:313-319.
- Nguyen KB, Cousens LP, Doughty LA, Pien GC, Durbin JE, Biron CA** (2000) Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat Immunol* 1:70-76.
- Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE, Biron CA** (2002a) Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 169:4279-4287.
- Nguyen KB, Watford WT, Salomon R, Hofmann SR, Pien GC, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Biron CA** (2002b) Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 297:2063-2066.
- Nikodemova M, Watters JJ, Jackson SJ, Yang SK, Duncan ID** (2007) Minocycline down-regulates MHC II expression in microglia and macrophages through inhibition of IRF-1 and protein kinase C (PKC)alpha/betall. *J Biol Chem* 282:15208-15216.
- Noronha A, Toscas A, Jensen MA** (1993) Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 46:145-153.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG** (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:938-952.
- Okada K, Kuroda E, Yoshida Y, Yamashita U, Suzumura A, Tsuji S** (2005) Effects of interferon-beta on the cytokine production of astrocytes. *J Neuroimmunol* 159:48-54.
- Ordenstein, L** (1867) Sur la paralysie agitante et la sclérose en plaques généralisée, pp. 49-81, Plate II. Paris, Martinet, 1867
- Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA** (1990) T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346:183-187.
- Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP** (1987) Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1:893-895.
- Paterson PY** (1960) Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med* 111:119-136.

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. 1993 [classical article]. *Neurology* 57:S10-S15.

Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202:8-32.

Platanias LC (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5:375-386.

Preble OT, Black RJ, Friedman RM, Klippel JH, Vilcek J (1982) Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* 216:429-431.

Prinz M, Garbe F, Schmidt H, Mildner A, Gutcher I, Wolter K, Piesche M, Schroers R, Weiss E, Kirschning CJ, Rochford CD, Bruck W, Becher B (2006) Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116:456-464.

Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP (1999) Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol* 46:144-160.

Remlinger P (1905) Accidents paralytiques au cours du traitement antirabiques, *Annales de l'institut Pasteur* 19, Seite 625-646

Rep MH, Hintzen RQ, Polman CH, van Lier RA (1996) Recombinant interferon-beta blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells. *J Neuroimmunol* 67:111-118.

Rickert RC, Roes J, Rajewsky K (1997) B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 25:1317-1318.

Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933) Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 58:39-53

Rogge L, D'Ambrosio D, Biffi M, Penna G, Minetti LJ, Presky DH, Adorini L, Sinigaglia F (1998) The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs. *J Immunol* 161:6567-6574.

Rohn TA, Jennings GT, Hernandez M, Grest P, Beck M, Zou Y, Kopf M, Bachmann MF (2006) Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 36:2857-2867.

Rollins BJ (1996) Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 2:198-204.

Rubio JP, Bahlo M, Stankovich J, Burfoot RK, Johnson LJ, Huxtable S, Butzkueven H, Lin L, Taylor BV, Speed TP, Kilpatrick TJ, Mignot E, Foote SJ (2007) Analysis of extended HLA haplotypes in multiple sclerosis and narcolepsy families confirms a predisposing effect for the class I region in Tasmanian MS patients. *Immunogenetics* 59:177-186.

Ruddle NH, Bergman CM, McGrath KM, Lingenheld EG, Grunnet ML, Padula SJ, Clark RB (1990) An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 172:1193-1200.

Rudick RA (1999) Disease-modifying drugs for relapsing-remitting multiple sclerosis and future directions for multiple sclerosis therapeutics. *Arch Neurol* 56:1079-1084.

Runstrom A, Leanderson T, Ohlsson L, Axelsson B (2006) Inhibition of the development of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis by laquinimod (ABR-215062) in IFN-beta k.o. and wild type mice. *J Neuroimmunol* 173:69-78.

Sadovnick AD, Ebers GC, Dyment DA, Risch NJ (1996) Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* 347:1728-1730.

Scholz C, Patton KT, Anderson DE, Freeman GJ, Hafler DA (1998) Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *J Immunol* 160:1532-1538.

Shen Q, Zhang R, Bhat NR (2006) MAP kinase regulation of IP10/CXCL10 chemokine gene expression in microglial cells. *Brain Res* 1086:9-16.

Sinigaglia F, D'Ambrosio D, Rogge L (1999) Type I interferons and the Th1/Th2 paradigm. *Dev Comp Immunol* 23:657-663.

Sobel DO, Goyal D, Ahvazi B, Yoon JW, Chung YH, Bagg A, Harlan DM (1998) Low dose poly I:C prevents diabetes in the diabetes prone BB rat. *J Autoimmun* 11:343-352.

-
- Sotgiu S, Pugliatti M, Fois ML, Arru G, Sanna A, Sotgiu MA, Rosati G (2004)** Genes, environment, and susceptibility to multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 17:131-143.
- Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C (1978)** Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens. *Eur J Immunol* 8:539-551.
- Steinman L (2007)** A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13:139-145.
- Stetson DB, Medzhitov R (2006)** Type I interferons in host defense. *Immunity* 25:373-381.
- Stewart TA, Hultgren B, Huang X, Pitts-Meek S, Hully J, MacLachlan NJ (1993)** Induction of type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science* 260:1942-1946.
- Stewart VC, Giovannoni G, Land JM, McDonald WI, Clark JB, Heales SJ (1997)** Pretreatment of astrocytes with interferon-alpha/beta impairs interferon-gamma induction of nitric oxide synthase. *J Neurochem* 68:2547-2551.
- Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, Raine CS (2001)** Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* 166:7579-7587.
- Taams LS, van EW, Wauben MH (1999)** Antigen presentation by T cells versus professional antigen-presenting cells (APC): differential consequences for T cell activation and subsequent T cell-APC interactions. *Eur J Immunol* 29:1543-1550.
- 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.
- Thakker P, Leach MW, Kuang W, Benoit SE, Leonard JP, Marusic S (2007)** IL-23 is critical in the induction but not in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178:2589-2598.
- Tone M, Nolan KF, Walsh LA, Tone Y, Thompson SA, Waldmann H (1999)** Structure and chromosomal location of mouse and human CD52 genes. *Biochim Biophys Acta* 1446:334-340.

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.

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

Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23:99-103.

Tuohy VK, Yu M, Yin L, Mathisen PM, Johnson JM, Kawczak JA (2000) Modulation of the IL-10/IL-12 cytokine circuit by interferon-beta inhibits the development of epitope spreading and disease progression in murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 111:55-63.

Urich E, Gutcher I, Prinz M, Becher B (2006) Autoantibody-mediated demyelination depends on complement activation but not activatory Fc-receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18697-18702.

van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blomberg BM, Woody JN, Hartung HP, Polman CH (1996) Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 47:1531-1534.

van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S, Barkhof F, Miller DH, Moseley IF, Thompson AJ, Rudge P, McDougall A, McLeod JG, Ader HJ, Polman CH (1997) Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology* 49:351-357.

van FH, Saldanha M, Gilbertson D, Dudani R, Krishnan L, Sad S (2005) Reducing the stimulation of CD8+ T cells during infection with intracellular bacteria promotes differentiation primarily into a central (CD62L^{high}CD44^{high}) subset. *J Immunol* 174:5341-5350.

Wang X, Chen M, Wandinger KP, Williams G, Dhib-Jalbut S (2000) IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J Immunol* 165:548-557.

Wefer J, Harris RA, Lobell A (2004) Protective DNA vaccination against experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with induction of IFN β . *J Neuroimmunol* 149:66-76.

Wiendl H, Neuhaus O, Kappos L, Hohlfeld R (2000) [Multiple sclerosis. Current review of failed and discontinued clinical trials of drug treatment]. *Nervenarzt* 71:597-610.

Willer CJ, Dymont DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC (2003) Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12877-12882.

Wolfer A, Bakker T, Wilson A, Nicolas M, Ioannidis V, Littman DR, Lee PP, Wilson CB, Held W, MacDonald HR, Radtke F (2001) Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nat Immunol* 2:235-241.

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

Yousry TA, Major EO, Ryschkewitsch C, Fahle G, Fischer S, Hou J, Curfman B, Miszkiel K, Mueller-Lenke N, Sanchez E, Barkhof F, Radue EW, Jager HR, Clifford DB (2006) Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 354:924-933.

Zang YC, Li S, Rivera VM, Hong J, Robinson RR, Breitbach WT, Killian J, Zhang JZ (2004) Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol* 172:5120-5127.

Zehntner SP, Brickman C, Bourbonniere L, Remington L, Caruso M, Owens T (2005) Neutrophils that infiltrate the central nervous system regulate T cell responses. *J Immunol* 174:5124-5131.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. M. Prinz für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die konstruktiven Diskussionen sowie für die gute Arbeitsatmosphäre.

Für das Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie für wissenschaftliche Anregungen bedanke ich mich bei Prof. Dr. W. Brück.

Herrn Prof. Dr. D. Doenecke danke ich für die bereitwillige Betreuung der Arbeit seitens der Biologischen Fakultät und sein wissenschaftliches Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. U. Groß bedanke ich mich für die Bereitschaft, das Korreferat für diese Arbeit zu übernehmen.

Einen besonderen, herzlichen Dank geht an meine Kollegen Akki, Jenni und Karina für die gute Zusammenarbeit und die positive Stimmung

Allen Mitgliedern der Abteilung Neuropathologie, speziell auch Olga, Katja, Elke und Silke für die Hilfsbereitschaft und eine nette Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir vieles ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich immer zählen kann.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Hauke Schmidt
Geburtsdatum: 10.11.1976
Geburtsort: Göttingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschohle Gertenbach
1987 – 1989 Förderstufe Witzenhausen
1989 – 1993 additive Gesamtschohle Witzenhausen
1993 – 1996 *Otto-Hahn-Gymnasium* in Göttingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1996 - 1997 Zivildienst in den Gemeindepflege der Diakonie in Witzenhausen

Hochschulbildung

1997 - 2002 Studium der Biologie an der *Georg-August-Universität* zu Göttingen mit den Fächern: Mikrobiologie, Biochemie und Immunologie

1999 Vordiplomsprüfung mit den Fächern Mikrobiologie, Botanik, anorganische Chemie und physikalische Chemie

2001 – 2002 Diplomarbeit im *Institut für Mikrobiologie und Genetik* in Göttingen, Titel: „Einfluß von Hemmstoffen und verschiedenen Elektronenakzeptoren auf die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase“
Abschlussnote: sehr gut

Okt. 2002 – Sep. 2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im *Institut für Mikrobiologie und Genetik* in Göttingen

2004 – 2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im *Institut für Neuropathologie* in Göttingen

Puplikationen:

Djukic M, Mildner A, Schmidt H, et al. (2006) Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* 129:2394-2403.

Herrmann I, Kellert M, Schmidt H, et al. (2006) Streptococcus pneumoniae Infection aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis via Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 74:4841-4848.

Prinz M, Garbe F, Schmidt H, et al. (2006) Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116:456-464.

van Loo G, de Lorenzi R, Schmidt H, et al. (2006) Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nat Immunol* 7:954-961.

Dissertation

- Okt 2006 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im *Zentrum Pathologie, Abteilung Neuropathologie* in Göttingen unter der Leitung von Herrn PD. Dr. M. Prinz
- Sept 2007 Abgabe der vorliegenden Dissertation