Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld
und dem
Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried
Abteilung Neuroimmunologie
Leiter: Prof. Dr. Hartmut Wekerle

UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG UND ANWENDUNG HUMANER MONOZYTEN GENERIERTER DENDRITISCHER ZELLEN ZUR RESTIMULATION ANTIGENSPEZIFISCHER LANGZEIT-T-ZELLLINIEN AM BEISPIEL DER MULTIPLEN SKLEROSE

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Thomas Nickel

aus

München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. R. Hohlfeld
Mitberichterstatter:	Herr Priv. Doz. Dr. G. Hartmann
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Herr Dr. Ralf-Björn Lindert
Dekan:	Herr Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	07.04.2005

Für meine Tante

Frau Dr. Elisabeth Biebl

in Dankbarkeit und Bewunderung

DANKSAGUNG

Die Anfertigung dieser Dissertation wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung der Mitglieder der Arbeitsgruppe klinische Neuroimmunologie des Max-Planck-Institutes in Martinsried. An dieser Stelle möchte ich ihnen für die vielen nützlichen Gespräche und Anregungen danken. Insbesondere zu Dank verpflichtet bin ich:

Herrn Prof. R. Hohlfeld für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor, für die Überlassung des Arbeitsthemas und für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Prof. H. Wekerle für die Arbeitsmöglichkeit in der Abteilung für Neuroimmunologie des Max-Planck-Institutes, Martinsried.

Herrn Dr. Ralf-Björn Lindert für eine sehr fachkundige und engagierte Betreuung und die lebhafte Diskussion der Arbeit.

Frau Martina Sölch für ihre qualifizierte Einarbeitung und ihre tatkräftige Unterstützung in vielen technischen Fragen.

Frau Dr. Stefanie Kämpchen für ihre Ermutigungen, stete Unterstützung und Inspiration.

Inhaltsverzeichnis 2

1.	EINLEITUNG	4
1.1	Definition und Vorkommen der Multiplen Sklerose	4
1.2	Pathologie der Multiplen Sklerose	5
1.2.1	Myelinscheide/ Myelinproteine/ Potentielle Antigene	5
1.2.2	T-Zell-System	6
1.3	Dendritische Zellen	8
1.3.1	Herkunft und Einteilung der Dendritischen Zellen	8
1.3.2	*In vivo* und *in vitro* Entwickung/Reifung von Dendritischen Zellen	9
1.3.3	Interaktion von T-Zellen und Dendritischen Zellen	11
1.4	Ziel der Arbeit	12
2.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	14
3.	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	Geräte und Chemikalien	16
3.1.1	Geräte	16
3.1.2	Chemikalien	16
3.1.2.1	Substanzen für Zellkulturmedien	16
3.1.2.2	Antikörper	16
3.1.2.3	Zytokine	17
3.1.2.4	Lösungen	17
3.1.2.5	Sonstige Substanzen	18
3.1.2.6	Antigene	19
3.1.3	Kulturmedien	19
3.1.3.1	T-Zellmedium	19
3.1.3.2	Herstellung des Monozyten konditionierten Mediums (MKM)	20
3.1.3.3	MGDZ-Medium	20
3.2	T-Zellkultur	20
3.2.1	Isolierung	20
3.2.2	Blutspenden für die Zellkultur	21
3.2.3	Isolierung der MOG-reaktiven Langzeit-T-Zelllinien	21
3.2.4	Bestimmung der Peptidspezifität	22
3.2.5	Bestimmung der CD4/CD8 Expression der MOG-spezifischen T-Zelllinien	22
3.2.6	Th1/ Th2-Charakterisierung der T-Zellen mittels durch Durchfluß-Zytometrie	23
3.3	MGDZ	24
3.3.1	Isolierung von Monozyten aus peripherem Blut und Buffy-coats	24
3.3.2	Charakterisierung der Monozyten mittels Durchfluß-Zytometrie	24
3.3.3	Ausdifferenzierung der Monozyten zu MGDZ durch Inkubation mit GM-CSF, IL-4 und TNF-α	25
3.3.4	Kinetische Untersuchung der Expression von Zelloberflächenmarkern, bei der Ausdifferenzierung von Monozyten zu MGDZ	26
3.4	Co-Kultur von MGDZ und Monozyten mit T-Zelllinien	26
3.4.1	Experimenteller Aufbau der Co-Kultur	26
3.4.2	Einfluss der Anzahl APZ auf die T-Zell-Proliferation	27
4.	ERGEBNISSE	28
4.1	Gewinnung einer homogenen Monozytenkultur	28

4.2	Monozyten generierte MGDZ	30
4.2.1	Kinetische Untersuchung zu Morphologie und Rezeptorexpression der sich differenzierenden MGDZ	31
4.2.1.1	MGDZ-Kultur am Tag 7	31
4.2.1.2	MGDZ-Kultur am Tag 8	31
4.2.1.3	MGDZ-Kultur am Tag 10	31
4.3	Phänotypen der antigenspezifischen T-Zelllinien	33
4.3.1	Proliferationsassay zur Bestimmung der Peptidspezifität der T-Zelllinien	33
4.3.2	Charakterisierung der für die Co-Kultur mit MOG-spezifischen T-Zelllinien eingesetzten APZ	35
4.3.3	Vergleich der Restimulationskapazität von Monozyten und MGDZ anhand MOG-spezifischer T-Zelllinien	36
4.3.4	Vergleich des Zytokinprofils MOG-spezifischer T-Zelllinien nach Restimulation mit Monozyten oder MGDZ als APZ	37
5.	DISKUSSION	42
5.1	Vergleich von Monozyten und MGDZ in der Restimulation MOG-spezifischer Langzeit-T-Zelllinien	43
5.2	Vergleich des Zytokinprofils MOG-spezifischer T-Zelllinien nach Restimulation mit Monozyten bzw. MGDZ	47
5.3	Therapieoptionen und Ausblick	50
6.	ZUSAMMENFASSUNG	52
7.	LITERATURVERZEICHNIS	54
8.	ANHANG	72
8.1	Lebenslauf	72
8.2	Eigene Veröffentlichungen	74

1. EINLEITUNG

1.1 Definition und Vorkommen der Multiplen Sklerose

Die multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die mit einer Schädigung der Myelinscheide, der Oligodendrozyten und der Axone einhergeht und schließlich zu einer gliösen Vernarbung der Entzündungsherde führt. Die MS ist mit einer Inzidenz von 3-7/100.000 Einwohner und einer Prävalenz von 60-100/100.000 Einwohner eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Das Prädilektionsalter liegt im 2.–4. Lebensjahrzehnt, Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer (Noseworthy J et al., 2000; Hohlfeld R, 1997).

Die Ursachen für den Ausbruch dieser Entzündung im ZNS sind nur zum Teil geklärt. Ein wichtiger Faktor scheint eine Störung der Selbsttoleranz zu sein, bei der beispielsweise im Rahmen einer Entzündungsreaktion gegen ein exogenes Agens auch körpereigenes Gewebe Ziel der Immunreaktion wird. Die Autoimmunreaktion kann sowohl durch T-Zellen, als auch durch Antikörper vermittelt sein. Als Ursachen für diesen Zusammenbruch der Selbsttoleranz werden unter anderem Virus-Infektionen, genetische Prädisposition und Kreuzreaktionen zwischen fremden (z.B. Bakterien) und körpereigenen Proteinen („molekular mimicry“) vermutet. Es wird davon ausgegangen, dass autoreaktive T-Zellen in der „Peripherie“ aktiviert werden, die Blut-Liquor-Schranke überwinden und im Hirnparenchym von lokalen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie perivaskulären Makrophagen, Dendritischen Zellen (DZ) und Mikroglia, präsentierte (Auto)-antigene erkennen (Hohlfeld R, 1997; Link H et al.,1999). Dies führt dazu, dass z.B. Mikoglia und Astrozyten durch Cytokine (z.B. TNF-α, INF-γ, Lymphotoxin) zur Expression von Haupthistokompatibilitätskomplexen Typ II (Major histocompatibility complex oder MHC-II), und anderen Rezeptoren veranlasst werden (Link H et al., 1999; Hohlfeld R, 1997). MHC-II-Moleküle sind Oberflächen-Rezeptoren, die auf Zellen des Immunsystems (Makrophagen-Monozyten, B-Zellen) zu finden sind, und über

welche intrazellulär verarbeitete Proteine (z.B. Antigene) T-Zellen über deren T-Zell-Rezeptor (TZR) präsentiert werden.

Die Cytokine werden zunächst durch T-Zellen, später durch sekundär eingewanderte Entzündungszellen und aktivierte Gliazellen sezerniert.

Im Verlauf der Entzündungsreaktion steigt die Konzentration der entzündlichen Mediatoren schnell an und ändert das Milieu, wodurch die Blut–Liquor-Schranke durchlässiger wird und sekundäre Entzündungszellen wie Makrophagen und B-Zellen einwandern (Hohlfeld R, 1997). Die Makrophagen und B-Zellen schädigen ihrerseits die Myelinscheide. Makrophagen fragmentieren beispielsweise die Myelinscheide durch die Sekretion von Mediatoren wie reaktivem Sauerstoff, Eicosanoiden und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) und phagozytieren anschließend die Myelinbestandteile. B-Zellen können durch die Sekretion opsonisierender Autoantikörper die Demyelinisierung unterstützen oder durch Komplementaktivierung sogar induzieren (Archelos JJ et al., 2000).

1.2 Pathogenese der Multiplen Sklerose

1.2.1 Myelinscheide / Myelinproteine / Potenzielle Autoantigene

Als potenzielle Autoantigene konnten bestimmte Bestandteile der Myelinmembran identifiziert werden. Dazu gehören u.a. Myelin Basisches Protein (MBP) und Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG). Für MBP, das sich im kompakten Myelin des Hirnstamms und des Rückenmarks befindet, ist seit langem bekannt, dass im Tiermodell der MS, der „Experimentell Autoimmunen Enzephalomyelitis“ (EAE), durch die Injektion von MBP-spezifischen T-Zellen eine Entzündung im ZNS induziert werden kann (Wekerle H et al., 1994; Hohlfeld R, 1997).

MOG ist ein Protein, das sich auf der Plasmamembran von Oligodendrozyten und der Außenseite der Markscheiden befindet. Des weiteren ist MOG das einzige Protein, für das

sowohl demyelinisierende Autoantikörper, als auch enzephalopathische T-Zell-Antworten im EAE-Modell gezeigt werden konnten (Linington et al.,1993).

Es wird angenommen, dass T-Zellen, die gegen die oben aufgeführten Myelinproteine gerichtet sind, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der MS spielen (Hohlfeld R, 1997). Diese Annahme geht vor allem auf Ergebnisse aus dem Tiermodell der EAE zurück, in dem durch den Transfer antigenspezifischer autoreaktiver T-Zellen eine Entzündung im ZNS induziert werden kann. Beim Menschen lassen sich antigenspezifische T-Zellen gegen die oben aufgeführten Proteine sowohl bei Patienten mit MS als auch bei gesunden Probanden aus dem peripheren Blut isolieren. Diese können als Langzeit-T-Zelllinien kultiviert und charakterisiert werden (Wekerle H et al., 1994; Wekerle H et al., 1986).

1.2.2 T-Zell-System

Wie im Modell der EAE gezeigt werden konnte, spielen T-Zellen eine essentielle Rolle in der Pathogenese der Erkrankung.

T-Zellen können nach ihren Oberflächenmarkern in Cluster of Differentiation (CD) 4- und CD8- positive T-Zellen unterschieden werden. Die cytotoxischen CD8+ T-Zellen sind in der Lage, intrazellulär produzierte Proteinfragmente, die auf MHC-I-Komplexen präsentiert werden, zu erkennen. Diese T-Zellen erkennen z.B. infizierte Zellen und eliminieren diese mit Cytotoxinen, die in speziellen Lysosomen gespeichert sind (Hohlfeld R, 1997).

Die CD4+ T-Zellen werden je nach ihrer Funktion in T-Helfer- und T-Effektor-Zellen unterschieden. Beide erkennen auf MHC-II-Molekülen präsentierte Antigene. CD4+ Helfer T-Zellen sezernieren zwei unterschiedliche Cytokinprofile, die mit verschiedenen Funktionen einhergehen (Romagnani S, 2000; O´Garra A et al., 1994):

CD4+ T-Zellen, die Interferon(INF)-γ, TNF-α/-β und Leukotrien A sezernieren aktivieren vor allem Makrophagen und somit die zelluläre Abwehr. Dieser Typ wurden als Th1 klassifiziert (Romagnani S, 2000; Hohlfeld R, 1997).

CD4+ Th-Zellen, die Interleukin(IL)-4, IL-10 und IL-13 als Cytokinprofil aufweisen, aktivieren hauptsächlich naïve B-Zellen zur Produktion von Antikörpern und bedingen somit die Aktivierung der humoralen Abwehr. Diese erhielten die Bezeichnung Th2 (Romagnani S, 2000; Hohlfeld R, 1997).

CD4+ T-Zellen, die sowohl INF-γ als auch IL-4 sezernieren, wurden als Th0 klassifiziert. Es handelt sich bei diesen wahrscheinlich um Vorläufer der T-Effektorzellen.

In welche Art von Effektorzellen eine Ausreifung mündet, hängt sowohl von dem Aktivitätszustand der APZ, der Kostimulation, dem Chemokin- und Cytokinniveau, als auch der Art des Antigens ab (Del Prete G et al., 1998; Hohlfeld R, 1997).

Unter den APZ nehmen Dendritische Zellen eine besondere Position ein. Nur sie sind in der Lage naïve T-Zellen mittels MHC II-Molekül-gebundener Antigene zu aktivieren. So konnte auch für Autoantigene wie MOG und MBP gezeigt werden, dass diese von DZ *in vivo* präsentiert werden und über die Aktivierung von T-Zellen eine EAE induzieren können (Dittel B et al, 1999). Des weiteren spielen DZ eine entscheidende Rolle in der Induzierung des späteren Th1/2-Phänotyps der T-Zellen (Langenkamp et al., 2000; Rissoan MC et al., 1999).

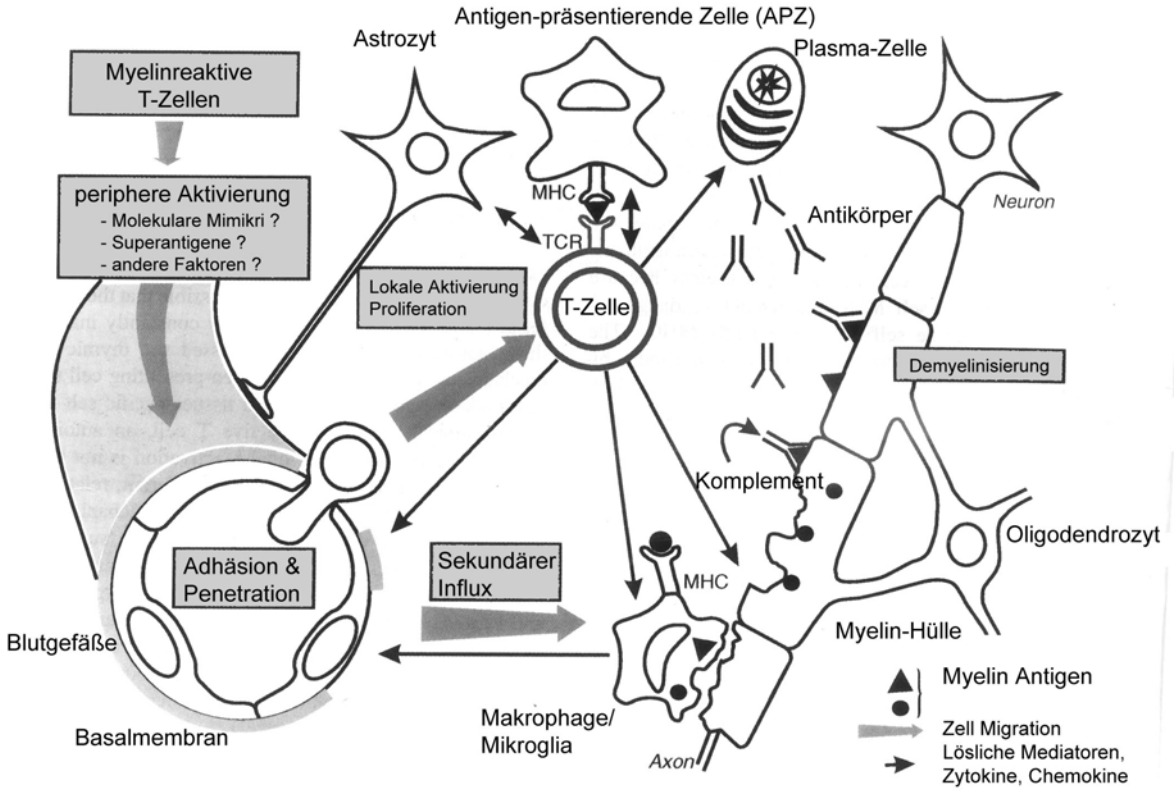


Fig.1 Führende Schritte in der Pathogenese der MS. Präexistierende T-Zellen werden außerhalb des ZNS aktiviert. Die aktivierten T-Zellen überwinden die Blut-Liquor-Schranke und werden lokal durch die Präsentation des Antigens durch lokale APZ reaktiviert. Die aktivierten T-Zellen sezernieren Cytokine, die dann Mikroglia und Astrozyten stimulieren, sekundäre Entzündungszellen rekrutieren und die Synthese von Antikörpern durch Plasmazellen induzieren. Anti-Myelin-Antikörper und aktivierte Makrophagen tragen vermutlich ebenso zur Demyelinisierung bei (Hohlfeld R; 1997).

1.3 Dendritische Zellen

1.3.1 Herkunft und Einteilung der Dendritischen Zellen

Die DZ stellen eine heterogene Familie von Zellen dar, die in ihrer Gesamtheit ein Netzwerk von Wächterzellen des Immunsystems bilden. Sie stammen von Leukozyten-Vorläuferzellen ab, die aus dem Knochenmark auswandern und über den Blutkreislauf in periphere Gewebe gelangen (Zhou LJ et al., 1996). Nach Lokalisation und Rezeptorexpression werden die DZ in epitheliale (Langerhans Zellen), interstitielle, Monozyten generierte DZ (MGDZ), CD11-negative- und CD11-positive DZ in den Reifezentren der Lymphknoten (LK) unterteilt (Caux C et al., 2000; Randolph GJ et al., 1999, Häusser G et al., 1997).

Des weiteren kommen DZ in den Meningen und dem Plexus choroideus vor. Es gelang auch der Nachweis von DZ im Liquor (Link H et al., 1999; Pashenkov M et al., 2001), wobei diese

in nur verschwindend geringer Zahl im Liquor von gesunden Menschen, aber in erhöhter Anzahl im Liquor von Patienten mit MS vorkamen. Ebenfalls zeigen Untersuchungen Ähnlichkeiten der zerebralen Mikroglia (z.B. CD11+) mit den DZ auf (Pashenkov M et al., 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass für DZ und Monozyten gemeinsame CD14-positive Vorläuferzellen existieren, aus denen sich entweder Monozyten oder DZ entwickeln können. Während unreife DZ sich wieder in Monozyten umwandeln können, sind ausgereifte DZ, dazu nicht mehr in der Lage. Die Ausbildung von DZ wird *in vivo* durch Entzündungsmediatoren wie z.B. Interleukine und Chemokine bedingt (Romani N et al., 1994). Mit der Abnahme des Differenzierungspotentials steigt das Antigen-präsentationspotenzial der DZ.

Diese Differenzierung von Monozyten zu DZ (MGDZ) lässt sich *in vitro* durch die Zugabe von Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und IL-4 zu Monozytenkulturen erreichen (Romani N et al., 1994; Robinson SP et al., 1997; Zou W et al., 2000).

1.3.2 *In vivo* und *in vitro* Entwicklung/Reifung von Dendritischen Zellen

Vereinfachend kann man die *in vivo* Entwicklungsstadien der DZ in 4 Schritte unterteilen: Die heterogenen Dendritischen Vorläuferzellen befinden sich im Knochenmark und Blut und sind in der Lage, eine große Anzahl proinflammatorischer und/oder antiviraler Cytokine zu produzieren und zu sezernieren. Diese DZ wandern in die peripheren Gewebe aus und differenzieren sich zu sogenannten unreifen DZ, die sich durch die Fähigkeit der Antigenaufnahme und das Fehlen kostimulatorischer Moleküle auszeichnen.

Unter Einwirkung bakterieller Zellwandbestandteile, viraler Doppelstrang-RNS, IL-1 und TNF-α und CD40/CD40-Ligand un-/abhängiger T-Zellen, entwickeln sie sich *in vivo* zu reifen DZ (Sallusto F et al., 2000; Drakesmith H et al., 2000).

In Kultur wird binnen der ersten 7 Tage durch die Zugabe von IL-4 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-Stimulierender-Faktor (GM-CSF) die Differenzierung zu MGDZ induziert, was sich an der Zunahme der Expression von HLA-DR, CD86 und Expression von MGDZ charakterisierender Rezeptoren wie CD1a, CD1c-, als auch der Reduktion von CD14 zeigt (Lanzavecchia A et al., Current Opinion of Immunology 2001; Puig-Kröger A et al., 2001).

Sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* zeichnen sich differenzierende DZ bzw. MGDZ nicht nur durch die Abnahme der Antigenaufnahmefähigkeit, sondern durch die Fähigkeit zur effizienten Stimulation der T-Zellen aus. Letzteres beruht auf der starken Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD54, CD58, CD80, und CD86, als auch der Translokation der MHC Klasse-II-Moleküle von den Lysosomen zur Zelloberfläche (Lanzavecchia A et al., Current Opinion of Immunology 2001; Huang YM et al., Cytokine 2001; Link H et al., 2001, Puig-Kröger A et al., 2001).

Die Expression von CD40-Ligand und CD83, die *in vitro* durch die Zugabe von TNF-α und „Monozyten konditioniertem Medium“ erreicht wird, kennzeichnet bei beiden Arten von DZ einen weiteren Ausreifungsschritt (Robinson SP et al., 1997). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass nur etwa 30-70% der *in vitro* gewonnenen DZ ausreifen, was möglicherweise auf eine fehlende T-Zellinteraktion zurückzuführen ist (Romani N et al., 1996).

Die Funktion des Rezeptors CD83 ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Eine Störung der Synthese des CD83 geht mit einer signifikanten Abnahme der T-Zell-Stimulationskapazität einher.

Neben diesen Veränderungen auf Rezeptorebene findet *in vivo* und *in vitro* gleichermaßen eine deutliche Änderung des lichtmikroskopischen Phänotyps der DZ statt. So bilden sich im Rahmen einer Reorganisation des Cytoskeletts nicht nur die mit der Reifung zunehmenden dendritischen Ausläufer aus, die in ihrer Gesamtheit den Eindruck von Schleiern vermitteln,

sondern es nehmen die Zellen auch an Größe und Anzahl der Granula zu (Romani N et al., 1996, Häusser G et al., 1997).

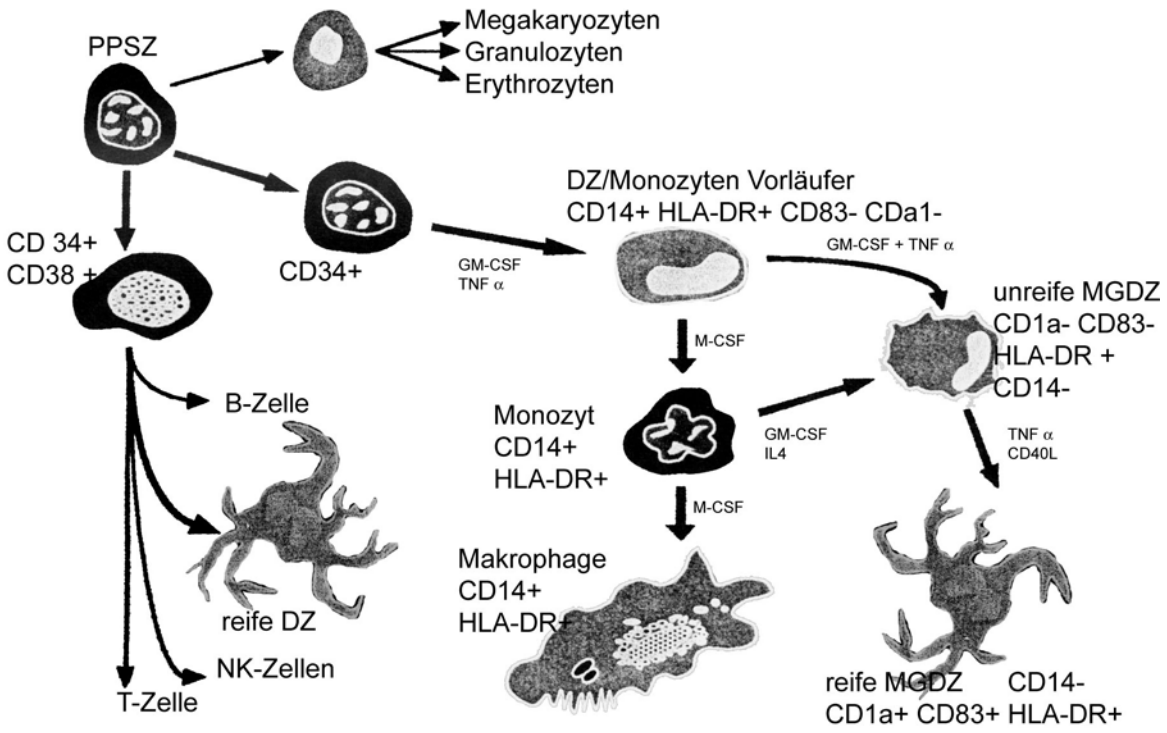


Fig.2 Hypothetischer Differenzierungsweg der DZ, basierend auf *in vitro* Studien (Robinson SP et al., 1997). PPSZ: Pluripotente Stammzellen; M-CSF: Makrophagen Kolonien stimulierender Faktor.

1.3.3 Interaktion von T-Zellen und Dendritischen Zellen

Der interzelluläre Kontakt zwischen T-Zelle und APZ entsteht über die „immunologische Synapse“. Die Signalübermittlung findet durch serielle Bindung des TCR an MHC Klasse II präsentierte Antigene und die Bindung kostimulatorischer Moleküle an die entsprechenden Rezeptoren statt. Dies löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, deren Größenordnung und Dauer den Eintritt der naïven T-Zellen in den Zell-Zyklus determiniert. Die T-Zell/DZ-Synapse ist eine dynamische Struktur. Vor allem T-Zellen versuchen, eine Synapse mit höherem Stimulations-Niveau zu formen und bewegen sich deshalb von einer APZ zur nächsten. Neben den beiden die Synapse formenden Zellen, der Dichte der MHC II-Moleküle und der kostimulatorischen Moleküle, spielen auch die umgebenden Strukturen (Kollagene,

Endothelzellen, Chemokine) beim Ablauf der Interaktion eine Rolle (Lanzavecchia A et al., Nature Immunolgy 2001; Lanzavecchia A et al., Curr Opin Immunol 2000).

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist, am Beispiel kultivierter MOG spezifischer Langzeit-T-Zelllinien den Einsatz von MGDZ als APZ zu untersuchen. Insbesondere wird dabei das Restimulationspotenzial der MGDZ bei diesen spezifischen T-Zelllinien im Vergleich zu Monozyten als üblicherweise bei der Kultivierung verwendeten APZ untersucht. Unter der Hypothese, dass MGDZ auch bei der Restimulation von T-Zellen anderen APZ überlegen sind könnten sich neben einer Entlastung der Probanden neue Untersuchungs- und Einflussmöglichkeiten der T-Zellkulturen ergeben.

2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APZ	Antigen präsentierende Zellen
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
DZ	Dendritische Zellen
EAE	Experimentell Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-Stimulierender-Faktor
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MBP	Myelin Basisches Protein
MEM	Minimal Essentieles Medium
MGDZ	Monozyten generierte Dendritische Zellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
MKM	Monozyten konditioniertes Medium
MOG	Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein
mRNS	Messenger Ribonuklein Säure
MS	Multiple Sklerose
PBMZ	aus peripherem Blut entnommene Mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin

PG	Prostaglandine
PMA	Phorbol Myristat Azetat
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TT	Tetanus Toxin
ZNS	Zentrales Nervensystem

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte und Chemikalien

3.1.1 Geräte

Bestrahlungsanlage	Siemens, München, Deutschland
Direkter Betacounter Matrix 9600	Packard, Frankfurt, Deutschland
Erntegerät	Packard, Frankfurt, Deutschland
Zentrifuge	Rotanta/Hettich, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Omnifuge, Deutschland
Glaspipetten	Brandt, Eppendorf, Deutschland

3.1.2 Chemikalien

3.1.2.1 Substanzen für Zellkulturmedien

AB-Serum, human	Blutspendedienst BRK, München, Deutschland
Fetales Kalbserum (FCS)	Gibco, Paisley, Großbritannien
Gentamycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Hepes-Puffer	Gibco, Paisley, Großbritannien
Interleukin 2, humanes rekombinantes	Hoffmann-LaRoche, Basel, Schweiz
L-Glutamin	Gibco, Paisley, Großbritannien
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, Großbritannien
RPMI-1640	Merck, Darmstadt, Deutschland
Thymidin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

3.1.2.2 Antikörper

CD1a anti-Human, CBL 524 Cymbus Biotechnology, U.K. 1:20

CD1c anti-Human, CBL 459 Cymbus Biotechnology, U.K. 1:20

CD3 FITC, F0818, DAKO, Hamburg, Deutschland 1:100

CD14 PE, Becton Dickinson 347497 Heidelberg, Deutschland 1:100

CD20 M0774, DAKO, Hamburg, Deutschland 1:20

CD83 zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Tedder, Seattle, USA 1:20

HLA-DR IOT2G-462, Immunotech, San Diego, USA 1:100

ISO IgG1, Becton Dickinson 347497, Heidelberg, Deutschland 1:100

ISO-PE Mouse IgG1 XO929, DAKO, Hamburg, Deutschland 1:200

ISO-FITC Mouse Ig FITC FQ479, DAKO, Hamburg, Deutschland 1:150

FITC Goat-Anti-Maus, DAKO, Hamburg, Deutschland 1:150

Anti-INF-γ FITC, Pharmingen, Hamburg, Deutschland 1:20

Anti-IL4-PE, PharMingen, San Diego,USA 1:8

Neg.Kontrolle R-PE, DAKO, Hamburg, Deutschland 1:100

Neg.Kontrolle FITC, Immunech, San Diego, USA 1:100

3.1.2.3 Zytokine

Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF)	zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Rene de Waal-Malefyt, San Diego, USA
Interleukin 2 (IL-2), rekombinant	Hoffmann-LaRoche, Basel, Schweiz
Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α)	Hoffmann-LaRoche, Basel, Schweiz
Interleukin 4 (IL-4), rekombinant	PromoCell, Heidelberg, Deutschland

3.1.2.4 Lösungen

PBS (pH 7,4)	40g NaCl, 6,9g NaH_2PO_4 x H_2O, Aqua dest. ad 5000ml
PAB	PBS + 2% BSA + 0,1% NaN_3
Permeabilisationspuffer	PBS + 0,1% Saponin
Fixationspuffer	Paraformaldehyd 4%

3.1.2.5 Sonstige Substanzen

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Baker, De Venter, Holland
γ-Globuline	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Filter für das Erntegerät	Packard, Frankfurt, Deutschland
Filter 0,2µm	Millipore, Billerica, USA
Filter 0,45µm	Millipore, Billerica, USA
^{3}H-Thymidin	Amersham, Braunschweig, Deutschland
Indometacin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Lymphoprep®	Nycomed, Oslo, Norwegen
Nycoprep®	Nycomed, Oslo, Norwegen
Tetanustoxin (TT)	Dr. Blackkolb, Behringwerke, Marburg, Deutschland
Transwell-Einsätze, Porengröße 0,4 µm	Costar, Fernwald, Deutschland
Trypsin 1x, 10x	Gibco, Paisley, Großbritannien
Tuberkulin	Statens Institute, Kopenhagen, Dänemark
MOG	Prof. Linington, Martinsried, Deutschland
MBP	Prof. Hohlfeld, Martinsried, Deutschland
BSA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
MOG-Peptide	Neosystem, Straßburg, Frankreich

Peptide	Aminosäuren	Aminosäurensequenz
1	1-26	GQFRVIGPRHPIRALVGDEVELPCRI
2	14-39	ALVGDEVELPCRISPGKNATGMELGW
3	27-50	SPGKNATGMELGWRPPFSRVVHL
4	38-60	GWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGD
5	50-74	LYRNGKDQDGDQAPEYRGRTELLKD
6	63-87	PEYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIRN
7	76-100	IGEGKVTLRIRNVRFSDEGGFTCFF
8	89-113	RFSDEGGFTCFFRDHSYQEEAAMEL
9	101-125	RDHSYQEEAAMELKVEDPFYWVSPG

Tabelle 1: Auflistung der einzelnen MOG-Peptide und ihre Aminosäurensequenzen (Lindert RB et al., 1999).

3.1.2.6 Antigene

Myelin Basisches Protein (MBP) wurde nach einem Standardprotokoll (Eylar EH et al., 1979) aus menschlichem Hirngewebe isoliert. Die Reinheit des MBP wurde mit Hilfe der Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)- Polyacrylamid (PA) Gelelektrophorese geprüft.

Rekombinantes Ratten S100β wurde in E.coli exprimiert und wie von Schmidt und Kollegen (1997) beschrieben aufgereinigt (vergleichbar der MOG-Aufreinigung (s.u.)). Die extrazelluläre Immunoglobulin-ähnliche Domäne von Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) wurde in einem E.coli-System exprimiert (Brehm U et al., 1999). Das rekombinante nichtglykosylierte MOG-Protein wurde mittels Ni-Chelat-Affinitätschromatographie auf Chelat Sepharose Fast Flow in 6 M Harnstoff durch einen kontinuierlichen Imidazolgradienten (0,5 bis 0,04 M) gefolgt von einem präparativen SDS-Gel gereinigt. Das Protein wurde aus dem Gel extrahiert, mit Methanol gefällt und dann in Acetatpuffer (pH 3) resuspendiert. Die Homogenität wurde mittels SDS-PAGE/Coomassie-Blaufärbung geprüft. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines Kits zur Proteinbestimmung (Peterson´s Modifizierung der Micro-Lowry Methode, Sigma) bestimmt.

Synthetisch hergestellte MOG-Peptide wurden von Neosystem (Straßburg, Frankreich) bezogen. Die Peptide waren der HPLC-Analyse zufolge ≥85 % rein.

3.1.3 Kulturmedien

3.1.3.1 T-Zellmedium

RPMI 1640-Medium mit 5% humanem AB-Serum, 1% Glutamin (0,2M) und 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 IU/ml Penicillin/10.000IU/ml Streptomycin). Dem zur Expansion der T-Zellen verwendeten Medium wurde zusätzlich IL-2 (Endkonzentration 7,5 U/ml in Primärkulturen und 30 U/ml in T-Zelllinien) zugegeben (Wekerle H et al.,1986).

3.1.3.2 Herstellung Monozyten konditionierten Mediums (MKM)

In destilliertem Wasser gelöste γ-Globuline (10mg/ml) wurden zu je 4ml (40mg) in die wells einer 6 well Platte pipettiert und für 2 Minuten inkubiert. Danach wurde 2x mit PBS gewaschen und anschließend 3ml einer zuvor mittels Dichtegradienten gewonnenen Monozytensuspension (1 Millionen Zellen/ml) in jedes well gegeben. Nach 24-28 h wurde das Medium aus den wells abpipettiert, zentrifugiert (1600U, 4°C ca.10 Minuten), der Überstand gefiltert (Porendurchmesser 0,2μm) und bei -20°C eingefroren (Romani N et al., 1996).

3.1.3.3 MGDZ-Medium

Alle MGDZ wurden in RPMI 1640-Medium mit 1% Glutamin (0.2M), 1% Penizillin/ Streptomycin, 1% Hepes-Puffer und 7,5% inaktiviertem FCS, bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert (Romani N et al., 1996).

3.2 T-Zellkultur

3.2.1 Isolierung

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMZ) wurden mit Hilfe eines diskontinuierlichen Dichtegradienten (Boyum A, 1976) aus EDTA-Blut isoliert.

Dazu wurde das Blut im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und in einem 50ml Röhrchen vorsichtig auf 15ml Lymphoprep® geschichtet und 45 min bei 800g zentrifugiert.

Es bildete sich eine Interphase aus, welche die mononukleären Zellen enthielt. Diese wurde abgeerntet, in ein 50ml Röhrchen überführt und 20 min bei 550 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10ml PBS resuspendiert und zum Entfernen der Thrombozyten für 10 min bei 100 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch 2 x wiederholt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl einer

0,5%igen Trypanblau-Lösung vermischt und anschließend davon 10 µl in eine Neubauer Zählkammer überführt und die lebenden Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

Nach dem Auszählen von 4x16 Kleinquadraten wurden die Zellzahl/ml nach folgender Formel berechnet:

Zellzahl/ml = Anzahl der ausgezählten Zellen x Verdünnung x 10^4/ Volumen

3.2.2 Blutspender für die Zellkultur

Für die Kultivierung von antigenspezifischen T-Zelllinien wurden ca.180ml EDTA-Blut von drei gesunden Probanden (mittleres Alter 28 Jahre +/- 4Jahre) eingesetzt. Diese standen alle 2-3 Wochen für Blutentnahmen zur Gewinnung von APZ zur Verfügung.

Zur Gewinnung von DZ wurden 38 Buffycoats (ungetestet auf HIV/Hepatitis-A/-B/-C) und den gesunden Probanden (s.o.) eingesetzt.

Alle Spender waren HLA-typisiert (Prof.Albert, Labor für Immunogenetik, Ludwig-Maximilians-Universität, München).

3.2.3 Isolierung der MOG-reaktiven Langzeit-T-Zelllinien

PBMZ ($2x10^5$/well) wurden in 96-well Rundboden-Mikrotiterplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark) in T-Zellmedium bei 37° C und 5% CO_2 kultiviert und mit rekombinantem humanem (rh) MOG (15 µg/ml) oder MOG-Peptiden (jeweils 10 µg/ml) stimuliert. Alle 4-5 Tage wurde IL-2-haltiges T-Zellmedium (15 U/ml), nach Absaugen des alten Mediums, zu den Kulturen hinzugefügt. Nach 4 Wochen wurden die MOG-reaktiven Zellen mit Hilfe einer Modifizierung der sogenannten „split-well"-Technik (Meinl E et al., 1993) identifiziert. Mit 50 Gy bestrahlte autologe PBMZ wurden als APZ benutzt. Die APZ ($1x10^5$/well) wurden entweder mit rhMOG (15 µg/ml), einem rekombinanten Kontrollprotein (rrS100ß; 15 µg/ml) oder ohne Antigen (als Negativkontrolle) vorinkubiert. Jedes well der Primärkultur wurde

anschließend auf drei wells mit den entsprechenden präinkubierten APZ aufgeteilt. Die MOG-Reaktivität wurde über drei Tage mit Hilfe eines Mikroskops bestimmt. Spezifische Proliferationsaggregate wurden auf 96-well-Platten überführt und durch Zusatz von IL-2 (30 U/ml Endkonzentration) im T-Zellmedium expandiert. Alle 16-21 Tage wurden die T-Zelllinien mit rhMOG, oder MOG-Peptiden restimuliert, und alle 3-4 Tage mit IL-2 -haltigem Medium (60 U/ml) versetzt.

3.2.4 Bestimmung der Peptidspezifität

Um die Peptidreaktivität der T-Zelllinien zu bestimmen, wurden mit 50 Gy bestrahlte PBMZ ($1x10^5$/well) mit oder ohne Antigen (rhMOG 15 µg/ml, MOG-Peptide 1.-9. jeweils 10 µg/ml, rekombinantes Kontrollantigen (rr S100β, 15 µg/ml), in Doppelansätzen in einer 96-Well Mikrotiterplatte in T-Zellmedium bei 37°C und 5% CO_2 präinkubiert. Nach 2h wurden jeweils $1x10^5$ der T-Zellen in jedes well pipettiert und nach einer 48 stündigen Inkubationszeit (37°C, 5% CO_2) mit [^{3}H]Thymidin (0.2 µCi) versetzt. Die Zellen wurden nach 66-68 h geerntet und der Einbau von [^{3}H]Thymidin wurde mit Hilfe eines direkten β–Zählers gemessen. Hierbei ist anzumerken, dass dieser ca. 20 % der Signale detektiert, die durch Flüssigkeitsszintillations-Messung nachweisbar sind.

3.2.5 Bestimmung der CD4/CD8 Expression der MOG-spezifischen T-Zelllinien

Die T-Zellen wurden in den 96 well-Kulturschalen mit 800g (4C°) über 5 Minuten zentrifugiert und der Mediumüberstand vorsichtig abgeschlagen. Die Zellpellets wurden in PAB resuspendiert und die einzelnen wells in eine 96-well-Spitzbodenplatte (auf Eis) überführt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand entfernt, und in frischem PAB resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation, wurden in PAB verdünnte nicht markierte monoklonale Antikörper (1-2 µg/ml Endkonzentration) gegen CD8, CD4 und die IgG1 Isotyp Kontrolle, in die entsprechenden wells gegeben. Die Antikörper wurden für 60

Minuten bei Dunkelheit auf Eis inkubiert. Es wurde zweimal mit PAB gewaschen und dann der mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) markierte monoklonale Sekundär Antikörper (Ziege-Anti-Maus) (1-2 µg/ml) auf die Zellen gegeben. Im selben Arbeitsgang wurde dann auch der direkt FITC markierte anti-CD3 Antikörper (1-2 µg/ml) und die entsprechende Isotyp Kontrolle (1-2 µg/ml) zu den Zellen pipettiert.

Die Antikörper inkubierten für ca. 60 Minuten auf Eis bei Dunkelheit. Die Zellen wurden anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen und in 200µl PBS aufgenommen. Die Messung wurde dann am Durchfluß-Zytometer durchgeführt.

3.2.6 Th1/ Th2-Charakterisierung der T-Zellen mittels Durchfluß-Zytometrie

MOG reaktive T-Zelllinien ($1x10^5$/well) wurden 15 Tage nach Restimulation unspezifisch mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) 5 µg/ml, und Ionomycin 250 ng/ml für 1 h oder mit dem spezifischen Antigen stimuliert und die Zytokinsynthese im Golgiapparat wurde durch zweistündige Inkubation mit Monensin (2 nmol/ml) geblockt. Die T-Zellen wurden in 96 well Spitzbodenplatten auf Eis überführt und zweimal mit PAB gewaschen, wobei die Zellen immer bei 800g (4°C) über 5 Minuten zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die T-Zellen über 20 Minuten mit Fixationspuffer fixiert und dann einmal mit PAB gewaschen. Nachdem die T-Zellen erneut wie oben zentrifugiert worden waren, erfolgte die Resuspendierung der Zellen in Permeabilisationspuffer, dem Antikörper gegen γ-IFN (FITC, 1µg/ml) oder IL-4 (PE, 1µg/ml) und die entsprechenden Negativkontrollen (R-PE 1µg/ml/FITC 1µg/ml) zugefügt waren.

Diese Antikörper inkubierten 60 Minuten bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen noch einmal in Permeabilisationspuffer gewaschen, bevor sie in 200µl PBS aufgenommen und am Durchfluß-Zytometer das Zytokinprofil bestimmt wurde.

3.3 MGDZ

3.3.1 Isolierung von Monozyten aus peripherem Blut und Buffy-coats

Als Ausgangsmaterialien dienten entweder 200 ml EDTA-Blut von gesunden Spendern, oder frische ungetestete Buffy-coats, die vom Bayrischen Roten Kreuz in München bezogen wurden. Das EDTA-Blut wurde in 50 ml Falcon Tubes mit einer 6%igen Dextranlösung (Sigma, Dextran 500000U in NaCl 0,9% zu Injektionszwecken) im Verhältnis 1/10 versetzt und bei Raumtemperatur über 40 Minuten stehen gelassen.

In dieser Zeit bildete sich eine Phase zwischen den sedimentierenden Erythrozyten und dem apikal befindlichen leukozytenreichen Plasma aus.

30ml des leukozytenreichen Plasmas wurden dann in einem 50 ml Röhrchen auf 10 ml des Dichtegradienten (Nycoprep®) geschichtet und für 15 Minuten bei 20°C und 800g (Heraeus Omnifuge 2.ORS) zentrifugiert. Die danach entstandene Interphase wurde geerntet und bei 800g (4°C) für 20 Minuten zentrifugiert (Hettrich, Rottanta/R). Nun wurde das Zellpellet zweimal in PBS resuspendiert und bei 800g (4°C) für 10 Minuten zentrifugiert.

Die Zellen wurden auf 1 Million/ml in DZ-Medium eingestellt und dann auf 6 well Platten (Falcon, Deep Plates) zu 3 ml pro well verteilt.

3.3.2 Charakterisierung der Monozyten mittels Durchfluß-Zytometrie

Die Monozyten wurden wie unter 3.2.5 beschrieben phänotypisch durch die Durchfluß-Zytometrie Analyse charakterisiert, wobei ca. 50.000 Monozyten pro Ansatz eingesetzt wurden. Es wurden nicht markierte monoklonale Antikörper (1-2 µg/ml Endkonzentration) gegen CD20, CD83, HLA-DR und die IgG1 Isotyp-Kontrolle (FITC) und ein FITC markierter Primärantikörper gegen CD3 und die IgG1 FITC Isotypen Kontrolle, als auch ein PE markierter Primärantikörper gegen CD14 und die IgG1 PE Isotypen Kontrolle verwendet. Die nicht markierten Antikörper wurden durch einen FITC markierten Ziege-Anti-Maus monoklonalen Antikörper (1-2 µg/ml) visualisiert.

3.3.3 Ausdifferenzierung der Monozyten zu MGDZ durch Inkubation mit GM-CSF, IL-4 und TNF-α

Nachdem wie unter 3.1.3.2 beschrieben das MKM von den Monozytenkulturen gewonnen worden war, wurden in jedes well 3 ml des MGDZ-Mediums pipettiert. Dem MGDZ-Medium wurden 1000U IL4 /ml und 1600U/ml GM-CSF zugesetzt.

Am 3. und 5. Tag wurden jeweils 1,5 ml des MGDZ-Mediums pro well gegen frisches MGDZ-Medium mit einer IL-4-Konzentration von 1000U/ml und GM-CSF-Konzentration von 1600U/ml (Endkonzentration im well IL-4-500U/ml und GM-CSF-800U/ml) ausgetauscht.

Am 7. Tag wurden die MGDZ aus dem MGDZ-Medium in das MKM überführt. Zu diesem Zweck wurde zuerst das Medium aus der 6 well-Platte abpipettiert und verworfen. Daraufhin wurden die Zellpellets jedes einzelnen wells zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die auf den Böden der wells adhärierten unreifen MGDZ mittels eines Zell-Schabers („Rubber-Policeman“) gelöst und in PBS aufgenommen.

Die so gewonnenen Zellsuspensionen wurden bei 800g (4°C) für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in PBS aufgenommen, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nachdem die Zellen abermals in PBS gewaschen worden waren, wurden sie schließlich in 4ml MKM, dass mit 1000U/ml IL4, 1600/ml GM-CSF und 100U TNF-α/ml versetzt war, resuspendiert. Dann wurden je 2 ml in ein well einer neuen 6 well-Platte überführt (Romani N et al., 1996, Hagihara M et al., 2001, Zhou LJ et al., 1996).

Am 10. Tag wurden die reifen MGDZ einmal in PBS gewaschen und dann in PBS überführt, wobei hierdurch die restlichen in dem Medium befindlichen Zytokine entfernt wurden.

3.3.4 Kinetische Untersuchung der Expression von Zelloberflächenmarkern, bei der Ausdifferenzierung von Monozyten zu MGDZ

Die MGDZ wurden wie unter 3.2.5 beschrieben phänotypisch durch die Durchfluß-Zytometrie Analyse charakterisiert, wobei 30.000 MGDZ pro Ansatz eingesetzt wurden. Die Phänotypisierung erfolgte an den Tagen 7, 8 und 10. Es wurden nicht markierte monoklonale Antikörper (1-2 µg/ml Endkonzentration) gegen CD1a, CD1c, CD 20, CD83, HLA-DR und die IgG1 Isotypen Kontrolle, FITC-markierte Antikörper gegen CD3 und die IgG1 FITC Isotypen Kontrolle sowie PE-markierte Antikörper gegen CD14 und die IgG1 PE Isotypen Kontrolle verwendet (Hagihara M et al., 2001; Zhou LJ et al.,1996). Die nicht markierten Antikörper wurden durch einen FITC-markierten Ziege-Anti-Maus monoklonalen Antikörper (1-2 µg/ml) visualisiert.

3.4 Co-Kultur von MGDZ und Monozyten mit T-Zelllinien

3.4.1 Experimenteller Aufbau der Co-Kultur

Die Monozyten wurden 11 Tage vor dem nächsten Restimulationszeitpunkt der T-Zelllinien nach dem Protokoll unter 3.3.1 gewonnen, aufgereinigt und die Induktion zu MGDZ eingeleitet. Am 7. Tag der Kultur der MGDZ wurden dem MKM das für die T-Zellen spezifische MOG-Peptid in einer Konzentration von jeweils 15µg/ml hinzugefügt.

Die Antigengabe erfolgte am Tag 7, da mit der Zugabe des TNF-α und MKM die Ausreifung der MGDZ induziert wird und mit dieser die Fähigkeit der Antigenaufnahme, -prozessierung und –präsentation abnimmt (Romani N et al., 1996). Bei einer Zugabe des Antigens am Tag 10 hätte eine Anlagerung des Antigens an die MGDZ, nicht aber eine Prozessierung und Präsentation stattfinden können.

Die Isolierung der Monozyten, die mit den MGDZ verglichen werden sollten, erfolgte nach dem obigen Protokoll 2 Tage vor Restimulation der T-Zelllinien. Die Zugabe des MOG-Peptids erfolgte hier in gleicher Konzentration 2 Stunden vor T-Zell-Zugabe.

Die T-Zellen mit Monozyten als APZ bzw. mit MGDZ als APZ wurden jeweils in 2 Ansätze aufgeteilt. In dem einen Ansatz wurde das Zytokinprofil, in dem anderen die Proliferationsrate der T-Zellen nach Restimulation durch Monozyten, bzw. MGDZ als APZ untersucht.

3.4.2 Einfluss der Anzahl APZ auf die T-Zell-Proliferation

Die zur Restimulation anstehenden T-Zellen wurden in 15ml Röhrchen gesammelt, bei 800g (4°C) über 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PRMI 1640- Medium auf 100.000 Zellen pro well eingestellt. Es wurde RPMI-Medium ohne AB-Serum verwendet, um einen möglichen unspezifischen Proliferationsstimulus durch Serum-Proteine zu verhindern.

Die Antigen-präsentierenden Monozyten wurden in Doppelbestimmung auf 300, 3.000, 10.000 und 30.000 Zellen /well eingestellt. Um eine unspezifische Stimulation zu erkennen wurden in Doppelbestimmung 30.000 Monozyten ohne Antigen mitgeführt. Des weiteren ebenso in Doppelbestimmung 30.000 Antigen präsentierende Monozyten ohne T-Zellen zur Erfassung unspezifischer Hintergrundaktivität.

Die Einstellung der MGDZ erfolgte parallel zu den Monozyten in Doppelbestimmung von 300, 3.000, 10.000 und 30.000 pro well. Hier wurden ebenfalls in Doppelbestimmung von 30.000 DZ ohne Antigen und 30.000 Antigen präsentierende MGDZ ohne T-Zellen mitgeführt.

Die Co-Kultivierung der T-Zellen mit den APZ erfolgte nach Bestrahlung der APZ mit 50 Gy. Nach 48 Stunden wurde [^{3}H]Thymidin (0.2 µCi) hinzugegeben. Die Zellen wurden nach 66-68 h geerntet und der Einbau von [^{3}H]Thymidin wurde wie unter 3.2.4 beschrieben bestimmt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Gewinnung einer homogenen Monozytenkultur

Dar für die Gewinnung von MGDZ ist eine möglichst homogene Monozytenkultur essentiell ist, wurden verschiedene Aufreinigungsverfahren getestet.

Folgende Methoden wurden für die Aufreinigung der Monozyten verglichen:

1. Gewinnung von PBMZ über Dichtegradienten mit Lymphoprep (Dichte 1.077 g/mL); Adhärenz an Plastikoberfläche über 24h; Verwerfen der nichtadhärenten Zellen; Ablösen der Zellen mittels Trypsin bzw. Zell-Schabers („Rubber-Policeman“).

2. Wie unter 1., zusätzlich Negativselektion mittels T-Zell- (CD3) und B-Zell- (CD19) spezifischen Dynabeads; (eine Positivselektion mittels CD14 Dyna-Beads hielten wir für ungünstig, da sich gezeigt hatte, dass die Monozyten die Beads inkorporieren, und eine Beeinflussung der APZ-Funktion und des Differenzierungsvermögens nicht gänzlich ausgeschlossen waren.)

3. Gewinnung von Monozyten mittels Dichtegradient mit Nycoprep (Dichte 1.068 g/ml); Adhärenz an Plastikoberfläche über 24h; Verwerfen der nichtadhärenten Zellen; Ablösen der Zellen mittels Zell-Schabers („Rubber-Policeman“).

Nachdem wir die aus den verschiedenen Aufreinigungsverfahren resultierenden Monozyten-suspensionen mittels extrazellulärer Facs-Analyse verglichen hatten (Daten hier nicht aufgeführt), entschieden wir uns für das Aufreinigungsverfahren mit Nycoprep (Nr. 3), da es sowohl die höchste Reinheit ermöglichte und außerdem auch eine kostengünstige Variante darstellte (Details 3.3.1).

Abb.1 zeigt, dass die nach diesem Verfahren gewonnenen Zellen einer sehr einheitlichen Population von CD14-positiven Monozyten entsprachen. Diese Homogenität ist auch auf dem Foto1 der Monozytenkultur nach 24h Adhärenz zu sehen.

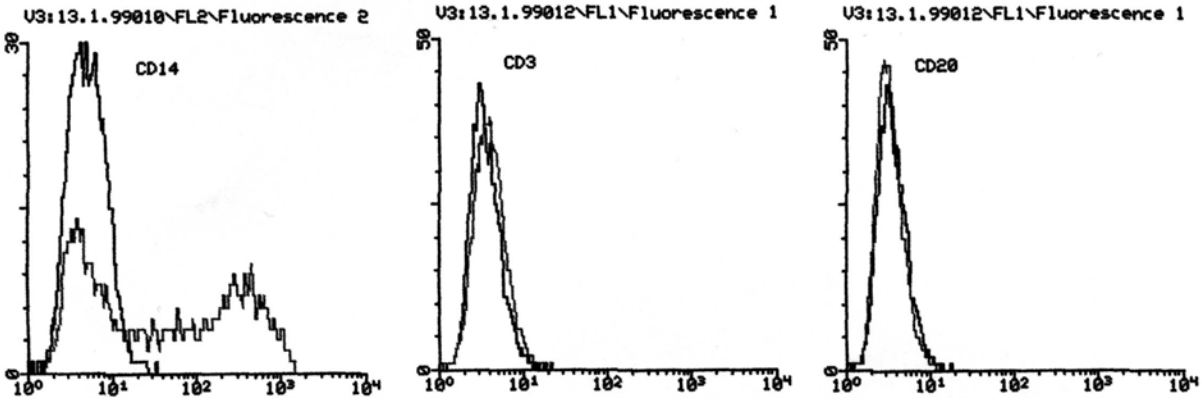


Abb. 1: Extrazelluläres FACS der Monozyten nach 24h Adhärenz
A: Isotypen-Kontrolle/CD14 B: Isotypen-Kontrolle/CD3
C: Isotypen-Kontrolle/CD20

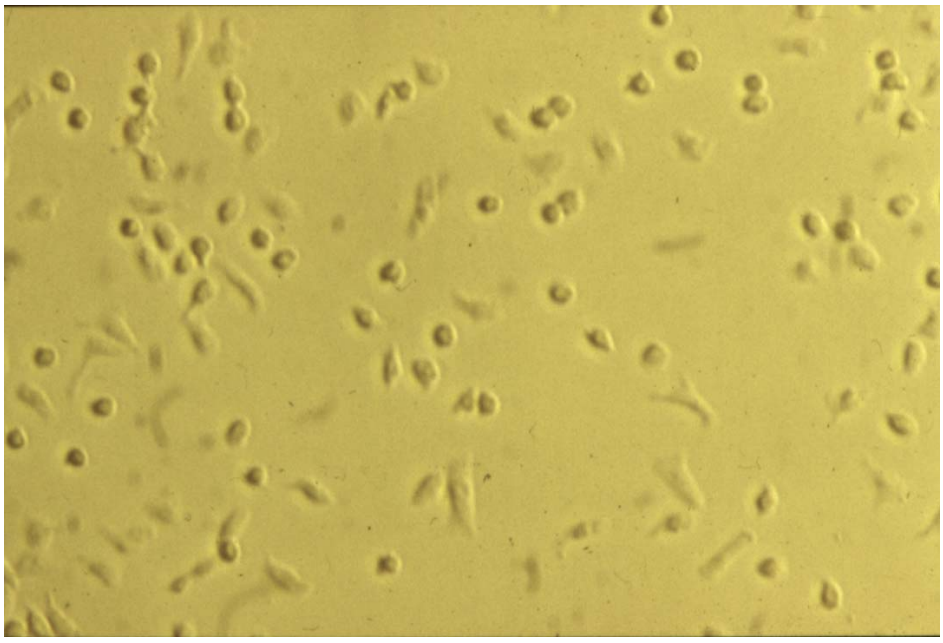


Foto 1: Monozytenkultur 24h nach Adhärenz, isoliert aus dem Buffycoat Nummer 29 (B29), 10fache Vergrößerung.

4.2 Monozyten generierte Dendritische Zellen

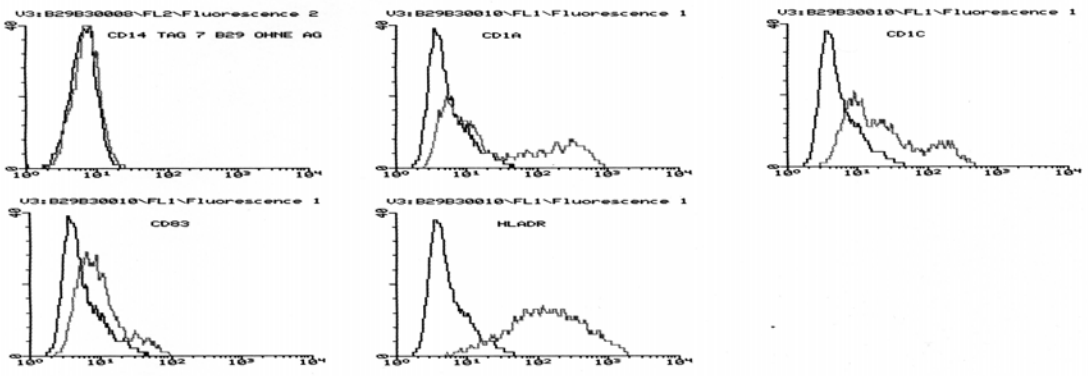
4.2.1 Kinetische Untersuchung zu Morphologie und Rezeptorexpression der sich differenzierenden MGDZ

Die aus dem Buffycoat 29 (B29) generierten MGDZ-Population wurde über den Verlauf von 10 Tagen hinsichtlich der Rezeptorexpression von CD1a, CD1c, CD14, HLA-DR und CD83 an Tag 0 (Abb.1), Tag 7 (Abb.2), Tag 8 (Abb.3) und Tag 10 (Abb.4) untersucht.

Man kann erkennen, dass das monozytentypische CD-14 Molekül an Tag 7 nicht mehr nachweisbar ist und das als Reifeindikator dienende CD83-Molekül nach Induktion der Ausreifung an Tag 7 (s.o.) an den Tagen 8 und 10 auf der Mehrzahl der Zellen exprimiert wird.

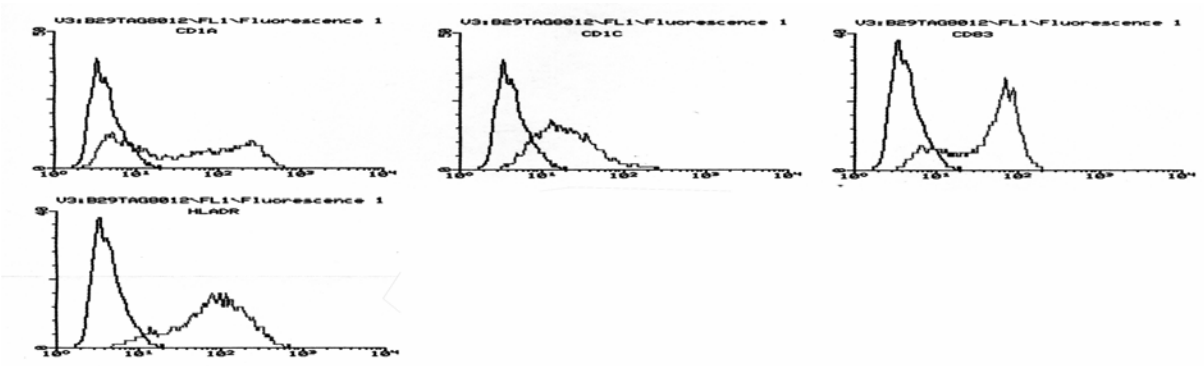
In den Fotos der Kulturen spiegeln sich die morphologischen Veränderungen, die sich im Rahmen des Differenzierungsprozesses einstellen, wieder. So zeigten sich in den Monozytenkulturen zu Beginn einzelne adhärente Zellen, mit teilweise rundlichem, teilweise flächig ausgezogenem Phänotyp (Foto1).

Mit Voranschreiten des Reifeprozesses verlieren die Zellen zunehmend ihre Adhärenz und nehmen ein homogeneres Erscheinungsbild an. Die Zellen werden größer und haben insgesamt eine rundliche Form, wobei sie zirkulär viele bewegliche Zellausläufer, die in ihrer Gesamtheit die sogenannten „veils“ („Schleier“)-, ausbilden (Romani N et al.,1996). Des weiteren kommt es zur Bildung von Zellkonglomeraten, sogenannten „good balls“ (Foto 3).



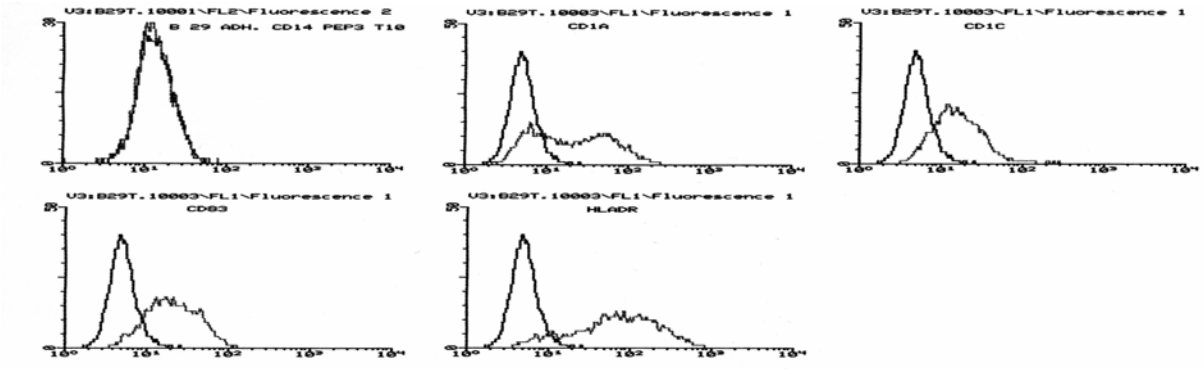
4.2.1.1 MGDZ-Kultur am Tag 7

Abb. 2: Expression CD14, CD1a, CD1c, HLA-DR und CD83 an Tag 7
A: Isotypen-Kontrolle/CD14 B: Isotypen-Kontrolle/CD1a
C: Isotypen-Kontrolle/CD1c D: Isotypen-Kontrolle/CD83
E: Isotypen-Kontrolle/HLA-DR



4.2.1.2 MGDZ-Kultur am Tag 8

Abb. 3: Expression CD1a, CD1c, HLA-DR und CD83 an Tag 8
A: Isotypen-Kontrolle/CD1a B: Isotypen-Kontrolle/CD1c
C: Isotypen-Kontrolle/CD83 D: Isotypen-Kontrolle/HLA-DR



4.2.1.3 MGDZ-Kultur am Tag 10

Abb. 4: Expression CD14, CD1a, CD1c, HLA-DR und CD83 an Tag 10
A: Isotypen-Kontrolle/CD14 B: Isotypen-Kontrolle/CD1a
C: Isotypen-Kontrolle/CD1c D: Isotypen-Kontrolle/CD83
E: Isotypen-Kontrolle/HLA-DR

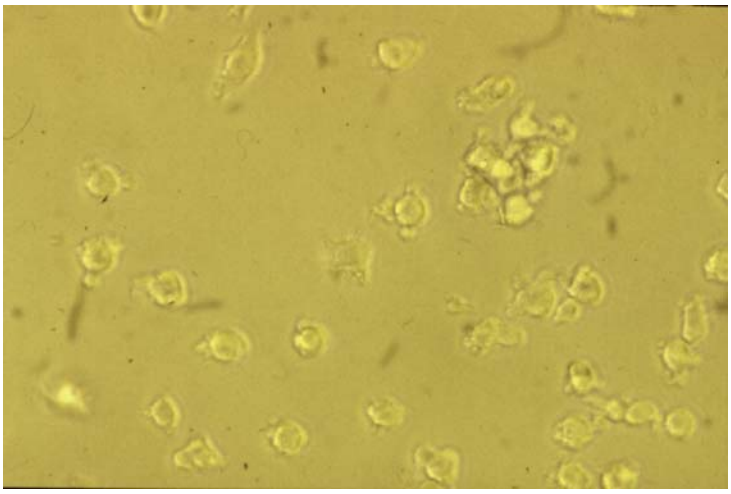


Foto 2: MGDZ 7d in Kultur vor Zugabe von 1000U IL-4/ml und 1600U/ml GM-CSF, 32fache Vergrößerung

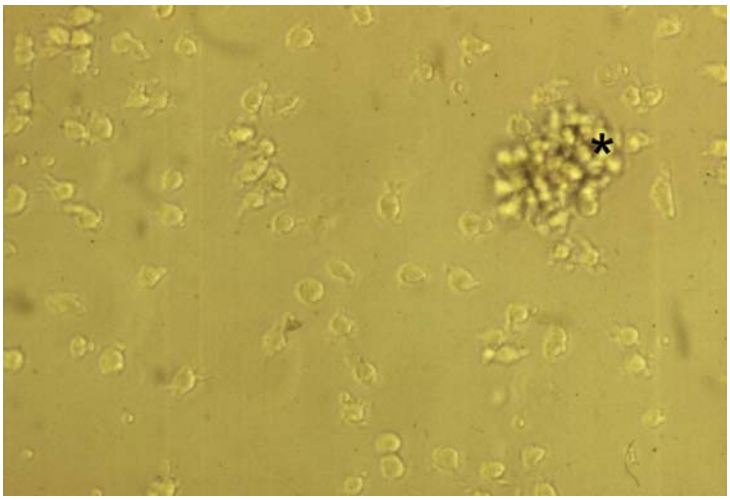


Foto 3: MGDZ am 8. Tag in Kultur mit 1000U IL-4/ml und 1600U/ml GM-CSF und 1 Tag mit 100U TNF-α/ml und MCM, 20fache Vergrößerung, mit sog. „good ball“(*) im rechten oberen Quadranten

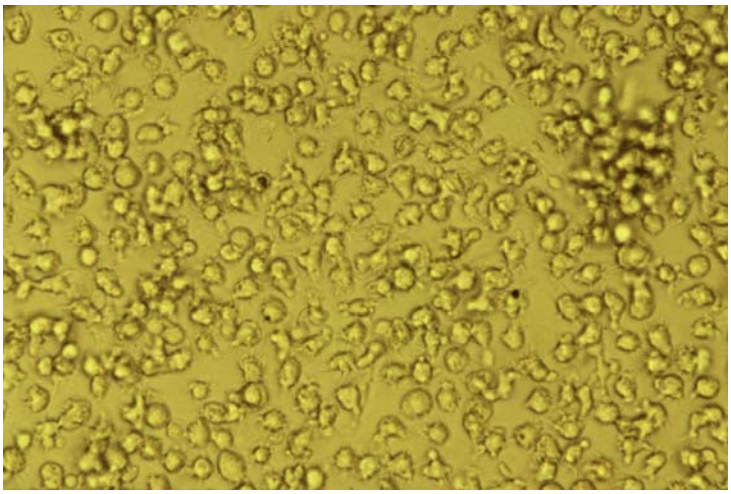


Foto 4: MGDZ am 10. Tag in Kultur mit 1000U IL-4/ml und 1600U/ml GM-CSF und 3 Tage mit 100U TNF-α/ml und MKM, 20fache Vergrößerung eines dichter bewachsenen Bereiches.

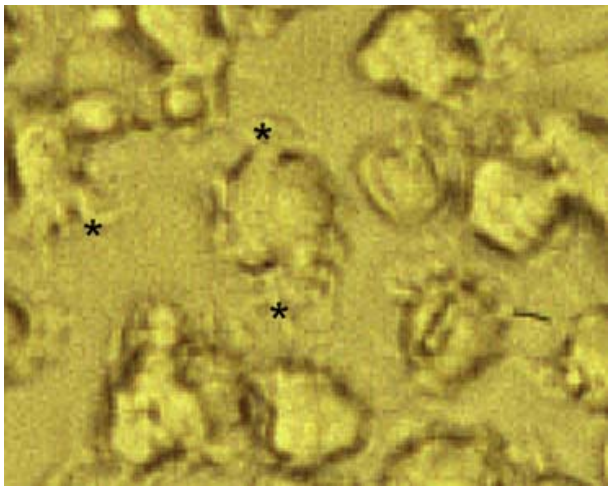


Foto 5: MGDZ des 10.Tag in Kultur 1000U IL-4/ml und 1600U/ml GM-CSF und 3 Tage mit 100U TNF-α/ml und MKM aus 32fache Vergrößerung mit typischen dendritischen Ausläufern (*) und angedeuteten schleierartigen Veränderungen.

4.3 Phänotypen der antigenspezifischen T-Zelllinien

4.3.1 Proliferationsassay zur Bestimmung der Peptidspezifität der T-Zelllinien

Die Peptidspezifität wurde wie oben beschrieben für die unterschiedlichen T-Zelllinien bestimmt. Folgende Anforderungen wurden an die peptidspezifischen T-Zelllinien gestellt:

1: eine absolute Proliferationsrate von mehr als 1000 „counts per minute“ (cpm) gegen rhMOG IgG und eins oder mehrere der synthetischen Peptide und 2: die Proliferationsrate gegen das spezifische Ag sollte mindestens 3x so groß sein, wie die Negativkontrolle ohne Antigen.

Das Ergebnis eines solchen Assays ist exemplarisch für die T-Zell-Linie Mm6 in Abb.5 dargestellt. Auf der X-Achse sind die verschieden Substanzen aufgetragen. So stellen die mit Pep1-9 bezeichneten Substanzen die Einzelpeptide des MOG-Antigens dar. Des weiteren findet sich das als Kontrollantigen mitgeführte rrS100ß, das mit rA bezeichnet ist.

Auf der Y-Achse der Abb.5 wurde nicht der Stimulationsindex sondern die „counts per minute“ aufgetragen, um exemplarisch die absolute Anzahl der registrierten Zähleinheiten zu verdeutlichen. Der in nachfolgenden Proliferationsassays verwandte Stimulationsindex ist der Quotient aus den Mittelwerten der „counts per minute“ der mit Antigen restimulierten T-

Zellen und den Mittelwerten der „counts per minute“ der ohne Antigen restimulierten T-Zellen. Der Stimulationsindex stellt somit die um die unspezifischen Stimulation korrigierten Ergebnisse dar.

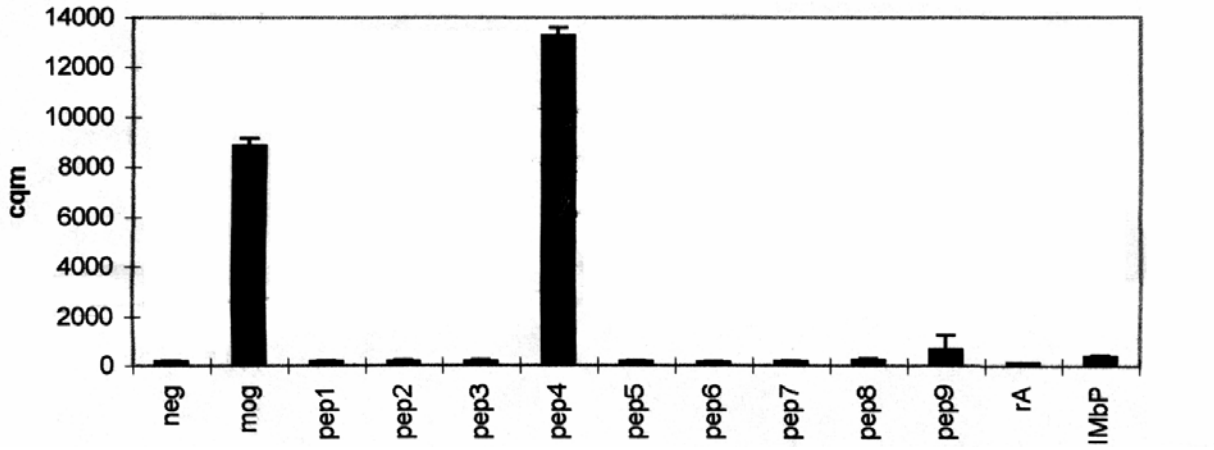


Abb. 5: Proliferationsassay der T-Zellline Mm6 des Spenders TN; Mog (Myelin Oligodendrozytisches Glykoprotein); Pep1-9 (Mog-Peptide Tab:1); rA (rrS100ß); MbP (Myelin Basisches Protein);

In der Tabelle 2 ist eine kurze Charakterisierung der Spender aufgezeigt.

Spender	Ater (Jahre)	Geschlecht	HLA-DR
TN	26	M	2,8
AST	27	M	1,2

Tabelle 2: Spenderdaten; TN, AST Initialen der Spender; M: männlich

Die unterschiedlichen Charakteristika der T-Zelllinien in Bezug auf Antigen- bzw. Peptidspezifität, Stimulationsindizes und Zytokinprofil sind in der Tabelle 3 zusammengefasst. Wie oben beschrieben wurden INF-γ-sezernierende T-Zellen als Th1 und IL-4 sezernierende T-Zellen als Th2 klassifiziert (Romagnani S, 2000; Hohlfeld R, 1997).

T-Zelllinie	Peptidspezifität	cpm MOG	cpm Neg.	Stimulation Index/ Pep	IL-4	INF-γ	IL-4& INF-γ	Th1/Th2
AST M1	Pep 3.	10055	20	609	<5%	**52%**	<5%	Th1
AST M10	Pep 3.	10616	970	11	**30%**	11%	11%	Th2
TN Mm6	Pep 4.	13600	240	57	<5%	**85%**	<5%	Th1
TN U1	Pep7.	2160	59	49	/	/	/	Th1

Tabelle 3: Charakteristika der T-Zelllinien, hinsichtlich Peptidspezifität, Cytokinprofil (jeweils höchster Wert hervorgehoben) nach antigenspezifischer Stimulation.

4.3.2 Charakterisierung der für die Co-Kultur mit MOG-spezifischen T-Zelllinien eingesetzten APZ

Die Monozyten wurden den Spendern ca. 48h vor Co-Kultivierung entnommen und erhielten das Antigen ca. 2h vor der Co-Kultivierung. Die Abb.6 zeigt die vom Spender-TN isolierten Monozyten 48h nach der Entnahme

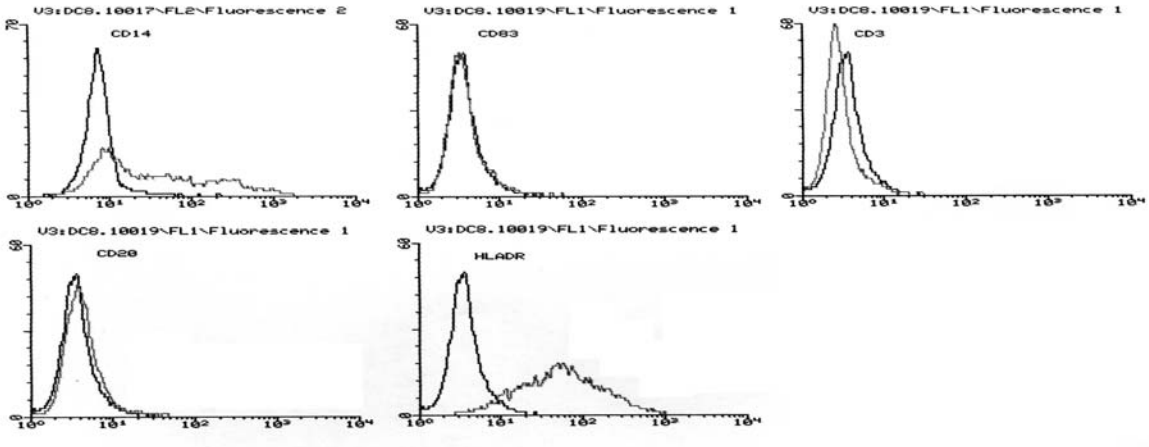


Abb. 6: Extrazelluläres FACS der Monozyten nach Adhärenz, Spender TN
A: Isotypen-Kontrolle/CD14 B: Isotypen-Kontrolle/CD83
C: Isotypen-Kontrolle/CD3 D: Isotypen-Kontrolle/CD20
E: Isotypen-Kontrolle/HLA-DR

Die Abb.7 zeigt die vom Spender-TN gewonnenen MGDZ nach 10 Tagen Kultivierung hinsichtlich der Expression von HLA-DR und CD83. Die Reinheit der Kultur wurde mit Hilfe des fehlenden Nachweises von CD3- und CD20- positiven Zellen erbracht. Der Reinheitsgrad entsprach demnach ≥95%.

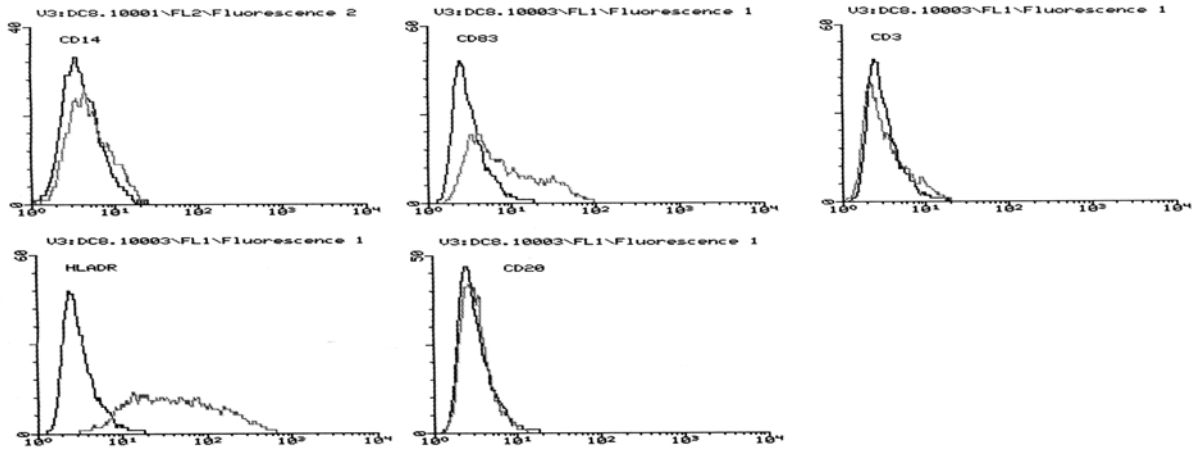


Abb. 7: MGDZ-TN; Expression CD3, CD14, CD20, HLA-DR und CD83 an Tag 10
A: Isotypen-Kontrolle/CD14 B: Isotypen-Kontrolle/CD83
C: Isotypen-Kontrolle/CD3 D: Isotypen-Kontrolle/HLA-DR
E: Isotypen-Kontrolle/CD20

4.3.3 Vergleich der Restimulationskapazität von Monozyten und MGDZ anhand MOG-spezifischer T-Zelllinien

Abb.8 zeigt exemplarisch die Stimulationsindizes für die T-Zelllinie TN-Mm6 nach Restimulation mit Monozyten, bzw. MGDZ bei steigender Zahl eingesetzter APZ (300, 3000, 10000 und 30000 Zellen/well).

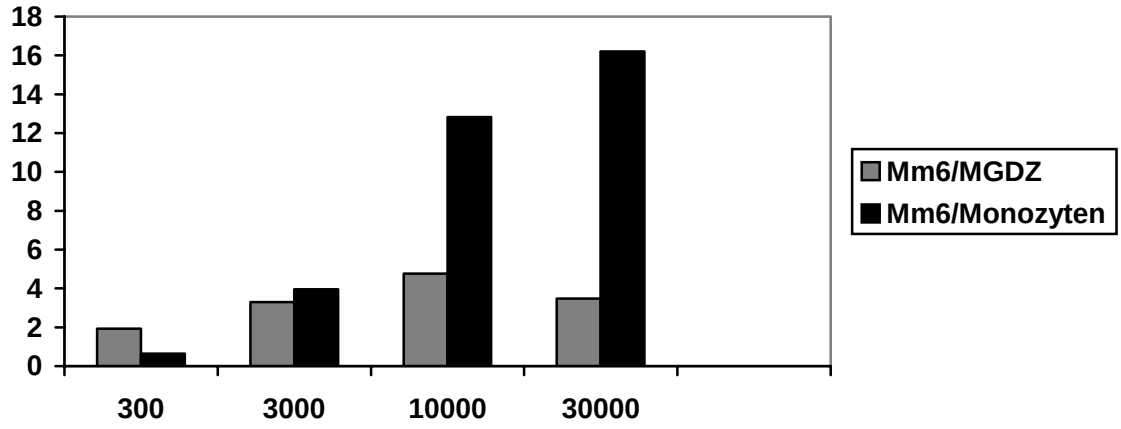


Abb. 8: Proliferationsassay TN-Mm6, Co-Kulturen mit Monozyten oder MGDZ; X-Achse: APZ pro Well, Y-Achse: Stimulationsindex

In der Tabelle 4 sind Stimulationsindices der Proliferationsassays der MOG-spezifischen T-Zelllinen Ast-M1, Ast-M10 und TN-Mm6 zusammengefasst, wobei bei den mit „/“ markierten Angaben aus technischen Gründen keine Werte erhoben werden konnten. In zwei

der drei Linien zeigte sich eine Überlegenheit der MGDZ in der Restimulation mit einem optimalen Verhältnis zwischen 1 MGDZ auf 10 – 33 T-Zellen. Bei sich weiter annäherndem Verhältnis von MGDZ und T-Zellen, nahm der Stimulationsindex wieder ab. Für Monozyten wurde der höchste Stimulationsindex jeweils für die höchste eingesetzte Zahl (entsprechend 1 : 3) erreicht.

		Stimulationsindex bei Anzahl (n) der eingesetzten APZ			
Zelllinie	APZ	n = 300	n = 3000	n = 10000	n = 30000
AST-M1	MGDZ	89,72	**180,48**	146,27	74,37
	Monozyten	4.99	/	12,40	**13,40**
AST-M10	MGDZ	12,79	**19,87**	7,8	7,03
	Monozyten	1,86	2,31	/	**2,95**
TN-Mm6	MGDZ	1.93	3,3	**4,76**	3,46
	Monozyten	0,65	3,96	12,82	**16,2**

Tabelle 4: Stimulationsindizes pro APZ bei T-Zelllinien AST-M1, AST-M10 und TN-Mm6; MGDZ-APZ-Fraktion AST-M1 und AST-M10 ca. 13% CD 83+ und 16% CD14+; TN-Mm6 19% CD83+ und <9% CD14+

4.3.4 Vergleich des Zytokinprofils MOG-spezifischer T-Zelllinien nach Restimulation mit Monozyten oder MGDZ als APZ

Im Rahmen der Typisierung der T-Zelllinien nach Restimulation mit MGDZ bzw. Monozyten nahmen wir eine Bestimmung der Zytokine IL-4 bzw. IFN-γ vor. Hierbei sollte gezeigt werden, ob sich eine Änderung im Phänotyp der T-Zelllinien einstellt.

Als Negativkontrolle dienten jeweils T-Zellinien, die entweder mit Monozyten oder MGDZ ohne Antigenzugabe restimuliert worden waren. In diesem Ansatz wurden bei Monozyten als auch bei MGDZ jeweils 30000 Zellen als APZ eingesetzt.

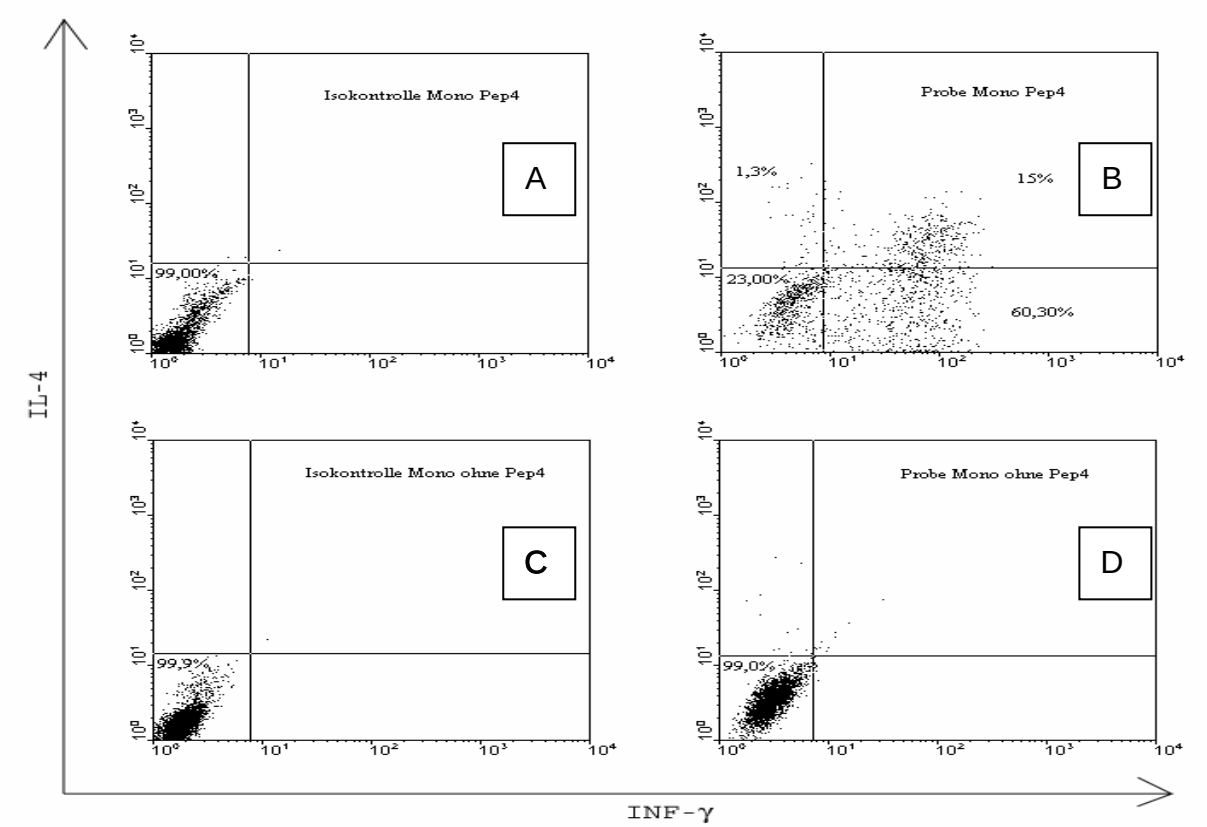


Abb. 9: Intrazelluläres Zytokin FACS der T-Zellline TN-Mm6; Monozyten (30000/ well) als APZ mit (A,B) und ohne (C,D) MOG-Peptid 4 (Pep4); A: Isotypen-Kontrolle; B: Anti-IL-4/Anti-IFN-γ; C: Isotypen-Kontrolle; D: Anti-IL-4/ Anti-IFN-γ

Die Abb.9-11 zeigen die Ergebnisse des intrazellulären Zytokinnachweises mittels FACS der Linie Mm6 in Co-Kulturen mit Monozyten (Abb. 9) oder MGDZ (Abb.10) mit bzw. ohne Antigen. So erkennt man sowohl bei den mit Monozyten, als auch bei den mit MGDZ restimulierten T-Zellen eine eindeutige IFN-γ-Produktion, was auf einen Th1–Phänotyp hinweist. Dieses Ergebnis wird auch in der Positivkontrolle, unter unspezifischer Stimulation mit Ionomycin und PMA bestätigt. Die geringe Anzahl an IL-4-positiven Zellen ist unter Berücksichtigung der Negativkontrolle als Hintergrund zu bewerten.

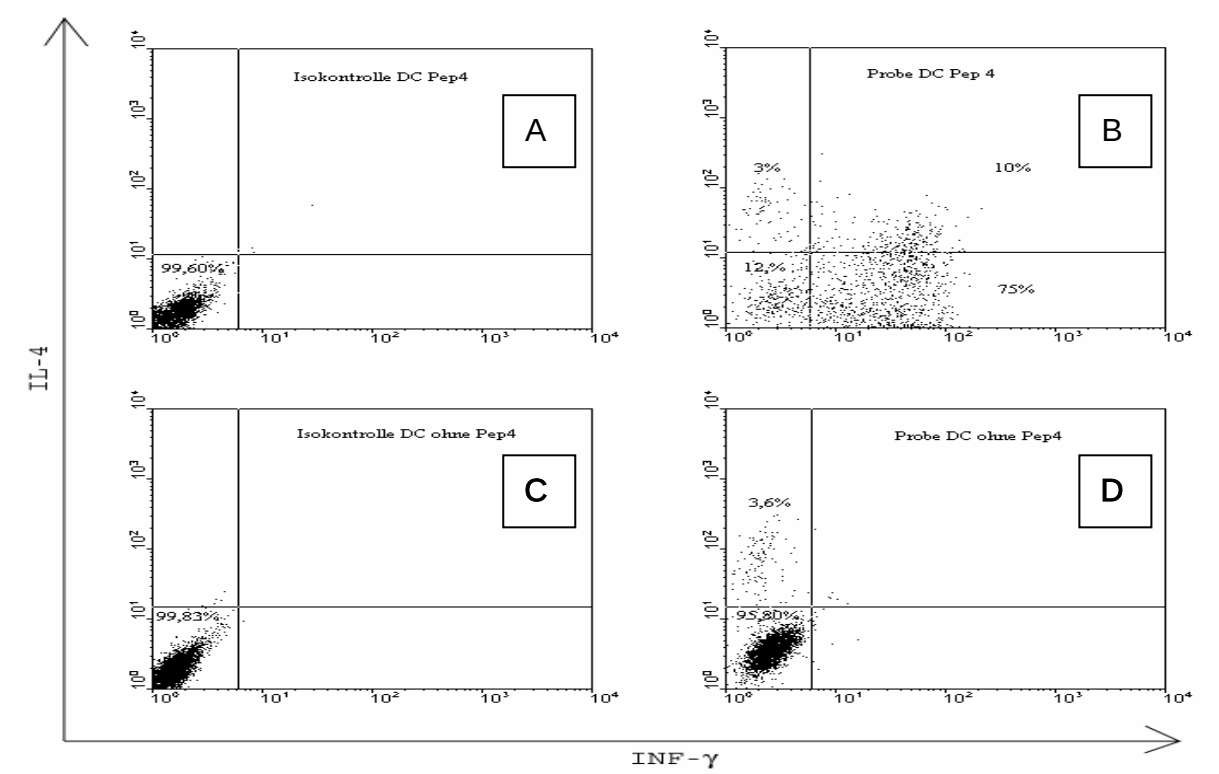


Abb. 10: Intrazelluläres Zytokin FACS der T-Zellline TN-Mm6; MGDZ (30000/well) als APZ mit (A,B) und ohne (C,D) Pep4; A: Isotypen-Kontrolle; B: Anti-IL-4/ Anti-IFN-γ; C: Isotypen-Kontrolle; D: Anti-IL-4/Anti-IFN-γ

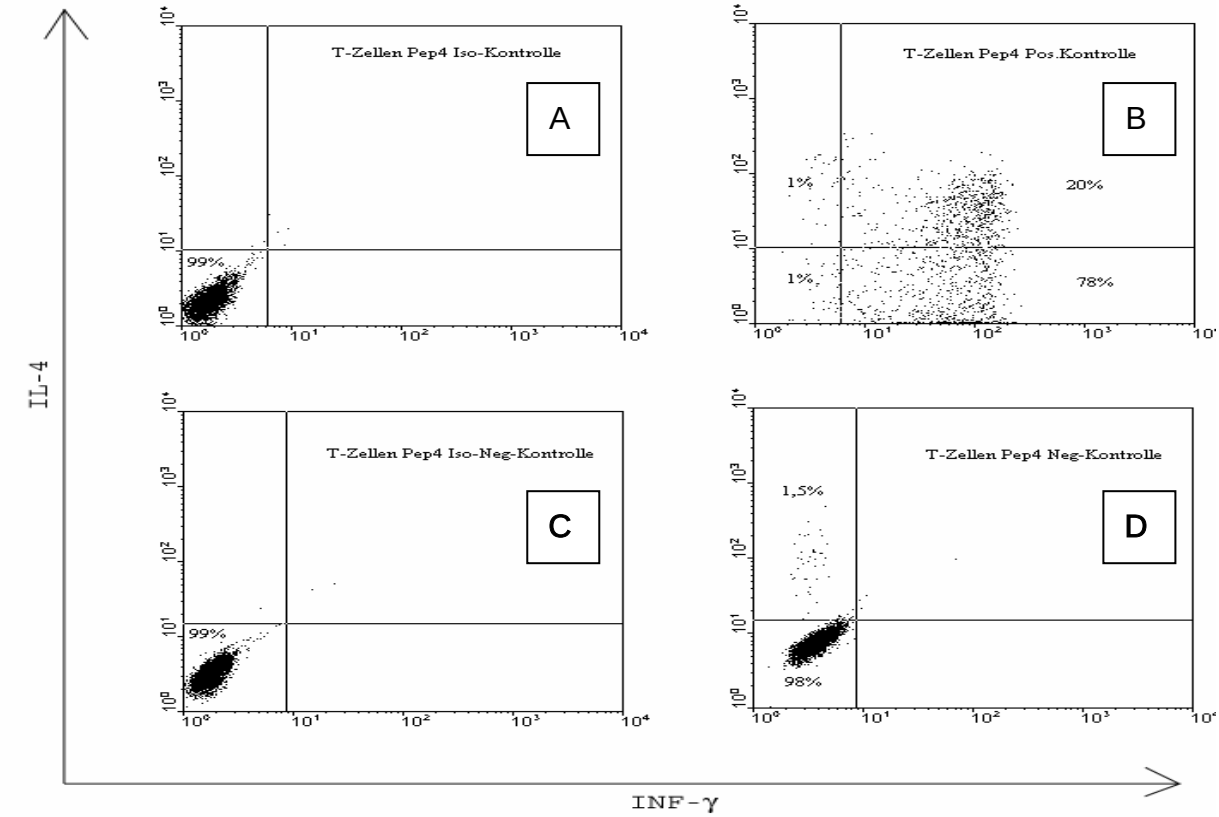


Abb. 11: Intrazelluläres Zytokin FACS der T-Zellline TN-Mm6; MGDZ (30000/well) als APZ mit Pep4, mit und ohne unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin (P/I); A: Isotypen-Kontrolle; B: P/I, C: Isotypen-Kontrolle; D: kein P/I

Die Tab.5 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der T-Zelllinien AST-M1, AST-M10 und TN-Mm6 in Bezug auf ihre Th1/2-Phänotypbestimmung. Die Prozentzahlen geben den jeweiligen Anteil Zytokin produzierender T-Zellen an.

Hierbei zeigen sich bei den Linien AST-M1 und AST-M10 Unterschiede in der Th1- bzw. Th2-Spezifität bei der antigenspezifischen Restimulation mit APZ und der unspezifischen Stimulation mit PMA/Ionomycin (P/I). Unterschiede im Zytokin-Profil nach Stimulation mit Monozyten oder MGDZ zeigten sich nicht.

T-Zell-linie	Peptidspezifität	Th1/ Th2	IL-4	INF-γ	IL-4& INF- γ	APZ (MGDZ oder Mono-zyten bzw. unspezifische Stimulation mit PMA und Ionomycin (P/I)
AST-M1	MOG 3.	Th1	<1%	**70%**	18%	MGDZ
AST- M1	MOG 3.	Th1	<2%	**13%**	<1%	Monozyten
AST-M1	MOG 3.	Th0	<5%	18%	**55%**	P/I
AST-M10	MOG 3.	Th2	**9,6%**	<1%	<1%	MGDZ
AST-M10	MOG 3.	Th2	**7%**	3%	3%	Monozyten
AST-M10	MOG 3.	Th0	19%	3%	**24%**	P/I
TN-Mm6	MOG 4.	Th1	<3%	**75%**	10%	MGDZ
TN-Mm6	MOG 4.	Th1	<2%	**60%**	15%	Monozyten
TN-Mm6	MOG 4.	Th1	<1%	**78%**	20%	P/I

Tabelle 5: Th1/Th2-Spezifität der T-Zelllinien AST-M1, AST-M10 und TN-Mm6 nach Restimulation mit MGDZ bzw. Monozyten, höchste Prozentzahl hervorgehoben

5. DISKUSSION

Ein wichtiges Werkzeug in der Charakterisierung potenziell autoimmuner T-Zellen ist die Isolierung und Expansion (auto-)antigenspezifischer Langzeit-T-Zelllinien *in vitro*. Am Beispiel der MS wurden Langzeit-T-Zelllinien gegen verschiedene Kandidatenautoantigene, darunter z.B. MBP und MOG, isoliert und untersucht. Für die Kultivierung dieser Langzeit-T-Zelllinien ist es erforderlich, die antigenspezifischen T-Zellen ca. alle drei Wochen mit dem entsprechenden Antigen erneut zu stimulieren. Dies erfordert regelmäßige Blutentnahmen von den untersuchten Probanden zur Gewinnung von APZ. Nachteilig an dieser Methode ist es, dass die untersuchten Probanden regelmäßig zur Verfügung stehen müssen und die rezidivierenden Blutentnahmen eine Belastung darstellen. Wenn das Spenderblut nicht erhältlich ist, müssen die T-Zelllinien entweder mit vorher eingefrorenen APZ restimuliert, oder aber die T-Zelllinien selbst bis zur Gewinnung frischer APZ eingefroren werden. Die Verwendung eingefrorener APZ birgt wiederum den Nachteil, dass es oft zu einer deutlichen Abnahme der Überlebensfähigkeit der T-Zellen kommt. Außerdem ist es für die weitere Kultivierung notwendig bei der nächsten Restimulation frische APZ zu verwenden. Das Einfrieren der T-Zelllinien führt zu einem Zellverlust von bis zu 20% und führt oftmals dazu, dass die verbleibenden Zellen nicht mehr restimuliert bzw. expandiert werden können.

DZ sind nach Literaturangaben hervorragend geeignet, naïve T-Zellen zu aktivieren und spielen eine entscheidende Rolle in der Induzierung des späteren Th-Phänotyps der T-Zellen (Langenkamp et al., 2000; Rissoan MC et al., 1999). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass sich funktionell gleichwertige DZ *in vitro* durch Zugabe von GM-CSF, IL-4 und TNF-α aus Monozyten (MGDZ) generieren lassen (Romani N et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit MGDZ zur Restimulation von antigenspezifischen Langzeit-T-Zelllinien eingesetzt werden können.

5.1 Vergleich von Monozyten und MGDZ in der Restimulation MOG-spezifischer Langzeit-T-Zelllinien

Antigen-spezifische T-Zelllinien können sowohl aus dem Blut gesunder Probanden, als auch von MS-Patienten isoliert werden (Lindert RB et al., 1999; Meinl E et al., 1993). In dieser Arbeit wurden MOG-spezifische Langzeit-T-Zelllinien gesunder Probanden eingesetzt. Für die Gewinnung ausreichender Zahlen an MGDZ werden üblicherweise 300 – 400 ml Blut benötigt (Romani N et al., 1996**)**. Die Etablierung des Systems wurde deshalb zunächst mit Buffy-coats und Blutproben gesunder Spender und vorerst nicht an MS-Patienten durchgeführt.

Eine aus dem peripheren Blut isolierte DZ ist in der Lage bis zu 3000 naïve T-Zellen zu stimulieren. Bei Verwendung von mononukleären Zellen als APZ wird ein Verhältnis von 1:1 bis 1:2 zu den zu stimulierenden T-Zellen angenommen, um eine adäquate Stimulation zu gewährleisten (Banchereau J et al., 1998, Krams R et al., 2003).

In unserem System würde dieses bedeuten, dass bei einem Einsatz von ca. 100.000 T-Zellen pro Well nur ca. 40 DZ im Vergleich zu den herkömmlich verwendeten 50.000 APZ zur Restimulation nötig wären.

Unsere Ergebnisse zeigen eine deutliche Überlegenheit der MGDZ in der Restimulation bei zwei von drei MOG-spezifischen Langzeit-T-Zelllinien (Abb.8 Seite 36). Das für naïve T-Zellen postulierte Verhältnis von DZ zu T-Zellen wurde allerdings nicht erreicht. Das Verhältnis MGDZ zu T-Zelle zeigte zwei Mal ein Optimum bei 1:33 (Tab.4 Seite 37). Bei weiter zunehmenden Zahlen an MGDZ nahm der Stimulationsindex hingegen wieder ab.

In allen drei Experimenten war noch ein Anteil von bis zu 16% CD14+ Zellen, mutmaßlich Monozyten/Makrophagen, in den DZ-Kulturen enthalten. Da die Stimulationsindizes mit Monozyten jedoch weit hinter denen durch MGDZ zurücklagen, kann der Einfluss der Monozyten in den DZ-Kulturen vernachlässigt werden.

Dass das für die Restimulation als optimal ermittelte Verhältnis von MGDZ zu T-Zelllinien nicht dem zwischen DZ und naïven T-Zellen entspricht, könnte mit dem unterschiedlichen Differenzierungsstadium der T-Zellen, der unterschiedlichen Abstammung der verwendeten DZ oder mit dem Reifungszustand der MGDZ erklärt werden.

Langzeit T-Zelllinien bestehen zum großen Teil aus Effektor-T-Zellen, die innerhalb von 0,5-2h, über den T-Zell-Rezeptor durch niedrige Konzentrationen des präsentierten Antigens stimuliert werden (Lanzavecchia A et al., Current Opinion of Immunology 2000; Lanzavecchia A et al., Cell 2001). Naïve T-Zellen hingegen müssen über ca. 6-30h über den TCR und über costimulatorische Moleküle, die das Signal über 100-fach verstärken, stimuliert werden (Lanzavecchia A, 1999).

Diese speziellen Fähigkeiten der DZ bzw. MGDZ auch auf geringste Antigenkonzentrationen eine T-Zell-Antwort zu induzieren, sind bei Effektor T-Zellen möglicherweise nicht erforderlich. Dies könnte erklären, warum nicht so hochspezialisierte Zellen (Monozyten) in kürzerer Zeit ähnlich effizient, oder sogar effizienter Effektor-Zellen stimulieren können.

Das in der Literatur angegebene T-Zell/DZ-Verhältnis bezieht sich auf direkt aus dem peripheren Blut isolierte DZ. Somit handelt es sich nicht um die in dieser Arbeit verwendeten MGDZ und auch nicht die funktionell und morphologisch vergleichbaren DZ, die sich *in vivo* aus Monozyten entwickeln und die fast ausschließlich in Gewebe, Lymphbahnen und Lymphknoten und nicht im peripheren Blut anzutreffen sind (Randolph GJ et al., 1999). Dieses könnte trotz einer morphologischen und funktionellen Ähnlichkeit dieser Vertreter der heterogen DZ-Familie die Diskrepanz bezüglich des Stimulationspotentials erklären

Die Frage bezüglich des Reifezustandes der MGDZ ist in so fern wichtig, als dass nur unreife DZ/MGDZ in der Lage sind Antigene über Pinozytose und Phagozytose aufzunehmen und anschließend zu prozessieren, während nur reife MGDZ (vermehrte Expression costimulatorischer Moleküle) in der Lage sind T-Zellen adäquat zu stimulieren (Cella M et al., 1997; Caux C et al., 2000).

In vivo können virale Doppelstrang-RNA, infektiöse Stimuli (z.B. LPS) und Zytokine (z.B. IL-1, TNF-α) auf die DZ als Reifestimulus wirken. Die Maturierung wird dann durch die Interaktion mit dem CD40-Liganden der T-Zellen abgeschlossen (Drakesmith H et al., 2000; Sallusto F et al., 2000; Romagnani S, 2000; Lanzavecchia A et al., Cell 2001).

In vitro wurde das zur Ausreifung notwendige TNF-α an Tag 7 der Kultur zusammen mit dem entsprechenden Antigen in die MGDZ-Kulturen gegeben.

Da auf diese Art eine deutliche Restimulation der T-Zellen erreicht werden konnte, kann angenommen werden, dass das zugegebene Antigen *in vitro* prozessiert und auch nach 72h (Beginn der Co-Kultur) auf MHC-II-Komplexen (der Reifeprozess verlängert die Expressions-Halbwertszeit der MHC-II-Antigen-Komplexe von ca.10h auf über 100h) präsentiert wurde (Lanzavecchia A, 1999; Lanzavecchia A et al., Current Opinion of Immunology 2000).

Diese Ansicht unterstützt auch die Beobachtung des Expressionsverlaufes des CD83 Rezeptors, der als Reifeindikator für MGDZ dient und dem eine wichtige Rolle als costimulatorisches Molekül (wie auch z.B. CD80 und CD86) in der Stimulation von T-Zellen zugeschrieben wird (Lechmann M et al., 2001; Robinson SP et al., 1997).

In unserem System wurde der CD83 Rezeptor erst nach Einleitung der Reifung mit TNF-α exprimiert, was darauf schließen lässt, dass die MGDZ bei Antigengabe noch unreif und damit zur Antigenaufnahme und –prozession befähigt waren (Romani N et al., 1996).

In unseren MGDZ-Kulturen lag die CD83 Expression zwischen 13-20% (in der Literatur 30-70%; Romani N et al., 1996). Dennoch bestand wie oben beschrieben eine deutliche Überlegenheit der MGDZ in der Restimulation bei zwei von drei MOG-spezifischen T-Zelllinien. Dieses Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die zu hohe MGDZ-Dichte in der extrazellulären FACS-Analyse (40.000-50.000 MGDZ) die Bindungsstellen an dem CD83-Rezeptor für den Anti-CD83-Antikörper nicht mehr zugänglich waren, und somit die CD83-Dichte als falsch zu niedrig gemessen wurde.

Gleichzeitig könnte es bei dieser MGDZ-Dichte auch zu einer Herunterregulation des CD83-Rezeptors gekommen sein.

Es konnte für den CD83 Rezeptor gezeigt werden, dass durch die Zugabe von der extrazellulären Domäne des CD83 zu reifen MGDZ es konzentrationsabhängig zu einer Abnahme der CD83 und CD80 Expression kommt, die mit einer deutlichen Verminderung des Stimulationspotentials des MGDZ einhergeht, was einen negativen Rückkopplungsmechanismus in Bezug auf die T-Zell-Stimulation vermuten lässt (Lechmann M et al., 2001).

Dieser negative Rückkopplungsmechanismus könnte außerdem auch erklären, warum es in unserem System ab einer Anzahl von 10.000 - 40.000 pro 10^5 T-Zellen eingesetzten MGDZ im Vergleich zu den Monozyten wieder zu einer Abnahme der Proliferationsindices kommt.

Eine andere Erklärung für diese Beobachtung könnte auch eine gegenseitige Inhibition sein: es handelt sich bei DZ um sehr große Zellen, die zusätzlich noch zahlreiche dendritische Ausläufer haben durch die es möglicherweise zu einer sterischen Behinderung kommt (Zhou LJ et al., 1996; Knight SC et al., 1983).

5.2 Vergleich des Zytokinprofils MOG-spezifischer T-Zelllinien nach Restimulation mit Monozyten bzw. MGDZ

DZ spielen eine essentielle Rolle bei der Differenzierung von primären T-Zellen. So ist die Dauer der TCR-Stimulation zusammen mit den polarisierenden Zytokinen entscheidend für die Differenzierung der CD4+ T-Zellen und führt letztendlich zu den Effektorzellen Th1/Th2 und ihren Zwischenstufen (Lanzavecchia A et al., Cell 2001; Cella M et al., 1997; Lanzavecchia A et al., Science 2000).

Die Zytokinproduktion von DZ ist abhängig von dem submikroskopischen Umfeld, der Kinetik der Reifung und dem Reifestimulus.

Ein Beleg für die Einflussnahme der Mikroumgebung auf die T-Zell/DZ-Interaktion findet sich z.B. darin, dass die Anwesenheit von Kollagen zu einer Verkürzung der Interaktionsdauer zwischen DZ und T-Zelle führt, während in kollagenfreien bzw. -armen Arealen wie z.B. in den Lymphknoten ein längerer Kontakt zwischen T-Zelle und DZ möglich ist (Lanzavecchia A et al., Nature Immunology 2001). So ist durch kollagenfreie *in vitro* Kulturbedingungen eine Verstärkung der T-Zellantwort denkbar.

Bezüglich der Reifungskinetik konnte gezeigt werden, dass eine Th1-Differenzierung in einem engen Zeitfenster von ca. 8-16h nach Beginn der Stimulation der T-Zellen durch Zytokine wie z.B. IL-12 induziert wird. IL-12 wiederum wird vor allem durch DZ produziert, die zuvor von aktivierten T-Zellen über Zytokine (z.B. INF-γ und IL-4) und Rezeptorkontakte (z.B. CD40-Liganden) stimuliert wurden (Lanzavecchia A et al., Cell 2001; Lanzavecchia A, 1999, Langenkamp A et al., 2000; Cella M et al., 1997). Andererseits wird die IL-12 Produktion von Zytokinen wie TNF-α, IL-1, oder IL-10 abgeschwächt (Zhou LJ et al., 1995; Hilkens CM et al., 1997; Rissoan MC et al., 1999).

Eine Th2 Differenzierung wird durch DZ ab 24h nach Beginn der Stimulation der T-Zellen durch die Zytokine IL-4 und IL-10 induziert. Diese Zytokine werden durch aktivierte T-Zellen und natürliche Killerzellen sezerniert.

Da IL-4 und IL-10 auch durch aktivierte T-Zellen sezerniert werden und gleichzeitig die Differenzierung in Th2-Zellen bewirken, entstehen sogenannte Zytokin-Schleifen, die zusammen mit TNF-α die Th2-Effektorantwort verstärken (Xiao GB et al., 1999; Lanzavecchia A, 1999; Zhou LJ et al., 1995; Hilkens C et al., 1997; Rissoan MC et al., 1999). Es konnte bereits gezeigt werden, dass unter Zugabe bestimmter Zytokine bzw. Medikamente es gelang, DZ mit bestimmten Zytokinprofilen zu differenzieren, die dann wiederum eine bestimmte T-Zell-Effektorantwort induzierten (Duddy ME et al., 2001).

Hinsichtlich der unterschiedlichen Reifestimuli zeigten Lanzavecchia et al. (1999), dass LPS, dsRNA und CD40-Ligand für eine Th1-Polarisierung eine Rolle spielen, während TNF-α eine Th2-Effektor-Antwort begünstigt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei bestehenden differenzierten Th1/Th2-Zelllinien sich durch die alleinige Antigenpräsentation durch MGDZ keine Änderung der T-Zell-Differenzierung ergibt.

Die Gründe für diese Beobachtung können bei den T-Zell-Linien und/oder den APZ liegen.

Die verwendeten T-Zelllinien wurden über 4-15 Monate in einem bestimmten Funktionszustand unter *in vitro* Bedingungen gehalten. So ist es denkbar, dass die T-Zellen unter diesen Bedingungen auf ein bestimmtes Zytokinprofil, sprich einen Funktionszustand, festgelegt sind. Dass bei den Zelllinien AST-M1- und AST-M10- sich unter maximaler unspezifischer Stimulation (PMA/Ionomycin) ein, im Vergleich zu den Monozyten bzw. MGDZ, anderes Zytokinprofil zeigt ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei den T-Zelllinien nicht um monoklonale sondern um oligoklonale Zelllinien handelt, bei denen unter unspezifischer Stimulation auch Klone stimuliert werden, die nicht spezifisch für MOG sind. Da diese Klone zuvor keine adäquate Stimulation erfahren haben, kommt es im Vergleich zu den MOG-spezifischen Klonen zu einer überproportionalen Stimulation, die sich dann in einer Änderung des Gesamt-Zytokinprofils darstellt. Da die Zelllinien AST-M1 und AST-M10 nur 4 bzw. 6 Monate in Gegensatz zur TN-M6-Linie mit 15 Monaten in Kultur

gehalten wurden, ist bei diesen „jüngeren“ Zelllinien von einer höheren Anzahl unspezifischer Klone auszugehen. Diese unspezifischen Klone werden im Verlauf der Kultivierung, da sie keine adäquate Restimulation erfahren wie bei der T-Zelllinie TN-Mm6 reduziert.

Da die Reifeinduktion der MGDZ mit TNF-α eine zur Th2-Antwort tendierende Differenzierung induziert (Lanzavecchia A, 1999) und die IL-12 Produktion von DZ mit einem engen Zeitfenster von ca. 8-16h nach Ausreifung verbunden ist, sollte eine Tendenz zur Th2-Differenzierung (ab 24h nach T-Zell-Stimulation) der Effektorzellen in dieser Versuchsanordnung zu erwarten sein, die aber in unseren Experimenten nicht zu beobachten war.

Eine Erklärungsmöglichkeit dafür könnte sein, dass nach der Bestrahlung der APZ mit 20 Gray ca. 70% der Zellen innerhalb von 48h apoptotisch werden (Cornelissen M et al., 2002). Es liegen auch Ergebnisse vor, die eine Apoptose in bis zu 90% bei mit 9 Gray bestrahlten Zellen schon nach 15h zeigen (Nakano H et al., 1994). Somit wäre denkbar, dass bei der Bestrahlung mit 50 Gray die MGDZ nach 24h, wenn dass zur Th2-Differenzierung prädisponierende Zytokinprofil überwiegt, nicht mehr in der Lage sind eine Th1/Th2-Shift zu induzieren. Die Restimulation der Th2-Linie könnte dennoch erfolgen, da die Antigenpräsentation die T-Zellen aktiviert und somit das bestehende Zytokinprofil induziert und dieses wiederum über Zytokin-Schleifen die Effektorantwort, hier Th2, unterstützt.

Dieses sich selbst und damit das bestehende Zytokinprofil unterhaltende Prinzip wäre auch bei den Th1-Linien denkbar.

5.3 Therapieoptionen und Ausblick

Ein Teil der Wirkung der heute routinemäßig zur Behandlung der MS verwendeten Medikamente (z.B. Methylprednisolon, INF-ß) beruht möglicherweise auf der Beeinflussung der DZ und ihrer Interaktionen.

So wirkt Methylprednisolon auf die DZ z.B. über die Verminderung deren Vitalität und durch Verschlechterung der T-Zell-Stimulationsfähigkeit, indem die costimulatorischen Moleküle herunterreguliert-, die IL-12-Produktion vermindert- und die IL-10 Produktion erhöht wird (Hohlfeld R, 1997; Duddy ME, 2001).

INF-ß bedingt z.B. durch Erhöhung der IL-10-Produktion, Reduktion der IL-12- und CD40 Expression, dass DZ vor allem eine Th2 T-Zell-Differenzierung induzieren (Huang YM et al., 1999).

Mit der Induktion der Th2 T-Zell-Differenzierung wird dann die Konzentration des vor allem von Th1-Zellen sezernierten INF-γ vermindert. Daraus resultiert schließlich, da erhöhte Konzentrationen von INF-γ mit einer Exazerbation der MS in Verbindung gebracht werden, eine Reduzierung der Wahrscheinlichkeit auf einen erneuten Schub der MS (Hohlfeld R, 1997; Huang YM et al., Cytokine 2001; Barthoholome E et al., 1999; Kroemer G et al., 1996).

Ein weiterer Therapieansatz wird in einer Toleranz-Induktion durch Desensibilisierung mittels autologer DZ gesehen. So wurden im Tiermodell der MS, der EAE unter anderem autologe DZ mit MBP, einem potenziellen Antigen autoaggressiver T-Zellen (Wekerle H, 1995; Wekerle H et al, 1986), *in vitro* aktiviert und mit verschiedenen Zytokinen (z.B. IL10, INF-β) kultiviert. Dann wurden diese autologen DZ den Spendermäusen reinjiziert, was sowohl das Ausbrechen der EAE, als auch weitere Schübe der EAE effektiv unterdrückte (Lanzavecchia A, 1999; Link H et al., 2001; Steinbrink K et al., 1997; Duddy ME et al. 2001; Link H et al., 1999).

6. Zusammenfassung

Das System der *in vitro* Kultivierung von antigenspezifischen T-Zelllinien und Antigen präsentierenden Zellen (APZ) stellt ein sehr komplexes und auch teilweise artifizielles System dar. Mit der *in vitro* Generierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten (MGDZ) besteht seit wenigen Jahren die Möglichkeit, die Interaktion von T-Zelllinien und MGDZ zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit war zu klären, ob Dendritische Zellen als Antigenträger in der Kultivierung von Langzeit-T-Zelllinien einen Vorteil gegenüber den bisher eingesetzten APZ haben. Dabei wurden Langzeit-T-Zelllinien einerseits mit MGDZ und andererseits mit Monozyten, als Hauptvertreter der verwendeten APZ, restimuliert.

Hierbei wurde das Restimulations-Potential der MGDZ gegenüber den Monozyten und der Einfluss auf das Zytokinprofil der T-Zellen in Bezug auf Th1 bzw. Th2 durch die unterschiedlichen APZ untersucht.

Die Resultate zeigen, dass die MGDZ bis zu einem APZ/T-Zell-Verhältnis von 1:30 einen Vorteil gegenüber den Monozyten in Bezug auf das Restimulations-Potential haben. Durch die alleinige Verwendung von MGDZ als APZ ließ sich kein Th1/Th2-shift bzw. Th2/Th1-shift von Langzeit-T-Zelllinien *in vitro* induzieren.

Die Verwendung von autologen MGDZ zur Restimulation von spezifischen T-Zelllinien ist zur Routine-Anwendung nicht geeignet, da dem Vorteil gegenüber PBMZ/Monozyten in Bezug auf das Restimulations-Potential erheblich höheren Kosten und ein unverhältnismäßig größerer Aufwand entgegensteht.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Arndt S, Vogt A, Markovic-Plese S, Martin R, Moldenhauser G, Wölpl A, Sun Y, Schadendorf D, Hämmerling G, Kropshofer H (2000): Functional HLA-DM on the surface of B-cells and immature dendritic cells. The EMBO Journal 19(6):1241-1251.

Appel H, Gauthier L, Pydrol J, Wucherpfennig KW (2000): Kinetics of T-cell receptor binding by bivalent HLA-DR. Peptide complexes that activate antigen-specific human T-cells. J Biol Chem 275(1):312-21.

Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP (2000): The Role of B Cells and Autoantibodies in Multiple Sclerosis. Annals of Neurology 47(6):694-704.

Banchereau J, Steinman RM (1998): Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392:245-251.

Barcellini W, Rizzardi GP, Borghi MO, Fain C, Lazzarin A, Meroni PL (1994): TH1 and TH2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients. AIDS 8(6):757-62.

Barthoholome EJ, Willems F, Crusiaux A, Thielemans K, Schandene L, Goldman M (1999): Interferon-β inhibits Th1 responses at the dendritic cell level relevance to multiple sclerosis. Acta Neurol Belg 99(1):44-52.

Belardelli F (1995): Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune

response. APMIS 103(3):161-79.

Berner B, Akca D, Jung T, Muller GA, Reuss-Borst MA (2000): Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. J Rhematol 27(5):1128-35.

Boyum A (1976): Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand J Immunol. Suppl 5:9-15.

Brehm U, Piddlesden SJ, Gardinier MV, Linington C (1999): Epitops specificity of demyelinating monoclonal autoantibodies directed against the human myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). J Neuroimmunol 97:9-15.

Brandt T, Dichgans J(1998): Neurologie, 3.Auflage.

Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean M-C, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A (2000): Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. Springer Semin Immunopathol 22:345-369.

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A (1997): Origin, maturation and antigen presenting funktion of dendritic cells. Curr Opin Immunol 9(1):10-6.

Cerruti A, Schaffer A, Shah S, Zan H, Liou HC, Goodwin RG, Casali P (1998): CD30 is a CD40-inducible molecule that negatively regulates CD40-mediated immunoglobin Class Switching in Non-Antigen-Selected Human B Cells. Immunity 9:247-256.

Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD (2002): Premyelinating Oligodendrocytes in Chronic Lesions of Multiple Sclerosis. The New England Journal of medicine 346(3):165-173.

Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC (1997): Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. Eur J Immunol 27:431-441.

Clark EA (1997): Regulation of B Lymphocytes by Dendritic Cells. J Exp Med 185(5):801-803.

Colavita AM, Reinach AJ, Peters SP (2000): Contributing factors to the pathobiology of asthma. The Th1/Th2 paradigm. Clin Chest Med 21(2):263-77.

Cornelissen M, Thierens H, De Ridder L (2002): Interphase death in human peripheral blood lymphocytes after moderate and high doses of low and high LET radiation: An electron microscopic approach. Anticancer Research 22:241-246.

Crowston JG, Salmon M, Khaw PT, Akbar AN (1997): T-Lymphocyte-fibroblast interactions. Biochemical Society Transactions. 25:529-531.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S (1993): Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. J of Immunol 150(2):353-60.

Del Prete G (1998): The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. Intern. Rev. Immunol.16(3-4):427-55.

De Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Masscrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Ait-Yahia-S, Banchereau J, Liu YJ, Lebecque S, Caux C (1998): The Cytokine Profile Expressed by Human Dendritic Cells is Dependent on Cell Subtype and Mode of Activation. The Journal of Immunology 160:1666-1676.

Dittel B, Visintin I, Merchant R, Janeway CA Jr. (1999): Presentation of the Self Antigen Myelin Basic Protein by Dendritic cells leads of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. The Journal of Immunology 163:32-39.

Drakesmith H, Chain B, Beverley P (2000): How can dendritic cells cause autoimmune disease? Immunoloy Today 21(5):214-217.

Dubois B, Vanbervliet B, Fayette J, Massacrier C, Van Kooten C, Breière F, Banchereau J, Caux C (1997): Dendritic Cells Enhance Growth and Differentiation of CD40-activated B Lymphocytes. J Exp Med 185(5):941-951.

Duddy ME, Dickson G, Hawkins SA, Armstrong AM (2001): Monocyte-derived dendritic cells: a potential target for therapy in multiple sclerosis (MS). Clin Exp Immunol 123(2):280-87.

Elenkov IJ, Chrousos GP (1999): Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. Trends Endocrinol Metab 10(9):359-368.

Eylar EH, Kniskern PJ, Jackson JJ (1979): Myelin basic protein. Methods Enzymol. 32B:323-41.

Girolomoni G, Riccardi-Castagnoli P (1997): Dendritic cells hold promise for immunotherapy. Trends in Immunology Today 18(3):102-104.

Goerdt S, Kodelja V, Schmuth C, Orfanos E, Sorg C (1996): The mononuclear phagocyte-dendritic cell dichotomy: myths, facts and a revised concept. Clin Exp Immunol 105:1-9.

Gupta S, Aggarwal S, Rashanravan B, Lee T (1998): Th1- and Th2-like cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in autism. J Neuroimmunol 85(1):106-9.

Gurdon JB, Dyson S, St Johnston D (1998): Cells´ Perception of Position in a Concentration Gradient. Cell 95:159-162.

Hagihara M, Shimakura Y, Tsuchiya T, Ueda Y, Gansuvd B, Munkhbat B, Chargui J, Ando K, Kato S, Hotta T (2001): The efficient generation of CD83 positive immunocompetent dendritic cells from CD14 positive acute myelomonocytic or moncytic leukaemia cells in vitro. Leuk Res 25(3):249-58.

Häusser G, Ludewig B, Gelderblom HR, Tsunetsugu-Yokota Y, Akagawa K, Meyerhans A (1997): Monocyte-Derived Dendritic Cells Represent a Transient Stage of Differentiation in the Myeloid Lineage. Immunobiol 197:534-542.

Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM,

Romani N, Schuler G (1996): Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-y production by T helper 1 cells. Eur J Immunol 26:659-668.

Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M, Kapsenberg ML (1997): human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factor to direct the development of the naïve T-helper cell toward the Th1 phenotype. Blood 1:90(5):1920-6.

Hohlfeld R, Meinl E, Weber F, Zipp F, Schmidt S, Sotgiu S (1995): The role of autoimmune T-lymphocytes in the pathologenesis of Multiple Sclerosis. Neurology 45(6):33-8.

Hohlfeld R (1995): T-Zell autoimmunity in multiple sclerosis. Immunolgy Today 16(6):259.

Hohlfeld R (1997): Biotechnological agents for the immuntherapy of multiple sclerosis. Brain 120:865-916.

Huang YM, Xiao BG, Özenci V, Kouwenhoven M, Teleshova N, Fredrikson S, Link H (1999): Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cell secreting pro-inflammatory cytokines. Journals of Neuroimmunology 99:82-90.

Huang YM, Link H (2001): Dendritic cells derived from patients with multiple sclerosis show high CD1a and low CD86 expression. Multiple Sclerosis 7(2):95-99.

Huang YM, Stoyanova N, Jin YP, Teleshova N, Hussien Y, Xiao BG, Fredrikson S, Link H (2001): Altered phenotype and function of blood dendritic cells in multiple sclerosis are modulated by INF-ß and IL-10. Clin Exp Immunol 124:306-314.

Huang YM, Hussien Y, Yarilin D, Xiao BG, Liu YJ, Link H (2001): Interferon-beta induces the development of type 2 dendritic cells. Cytokine 13(5):264-71.

Hughes HP (1998): Cytokine adjuvants: lessons from the past – guidelines for the future? Vet Immunol Immunopathol 63(1-2):131-8.

Imal Y, Yamakawa M, Kalajima T (1998): The lymphocyte-dendritic cell system. Histol Histopathol 13:469-510.

Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK (1997): In Vivo Detection of Dendritic Cell Antigen Presentation to CD4+ T Cells. J.Exp.Med. 185(12):2133-2141.

Ishida H, Ota H, Yanagida H, Dobashi H (1997): An imbalance between Th1 and Th2-like cytokines in patients with autoimmune diseases – differential diagnosis between Th1 dominant autoimmune diseases and Th2 dominant autoimmune diseases. Nippon Rinsho 55(6):1438-43.

Jangeway CA (1997): Immunologie 2. Auflage Spektrumverlag.

Kasakura S (1998): A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the pathogenesis of various human diseases. Rinsho Byori 46(9):915-21.

Kawakami K (1999): Factors for the onset of and the exacerbation of tuberculosis. 2 Host factors promoting the occurrence and exacerbation of tuberculosis: significance of Th1-Th2 cytokine balance. Kekkaku 74(10):735-40.

Knight SC, Mertin J, Stackpoole A, Clark J (1983): Induction of immune responses in vivo

with small numbers of veiled (dendritic) cells.
Proc. Natl. Acad.Sci.USA 80:6032-6035.

Kosnik M, Wraber B (2000): Shift from Th2 to Th1 response in immunotherapy with venoms. Pflugers Arch 440(5 Suppl):R70-1.

Kovacs E (2000): Serum levels of IL-12 and the production of IFN-gamma, IL-2 and IL-4 by peripheral blood mononuclear cells (PMBC) in cancer patients treated with Viscum album extract. Biomed Pharmacother 54(6):305-10.

Krams R, Segers D, Gourabi BM, Maat W, Cheng C, van Pelt C, van Damme L, de Feyter P, von der Steen T, de Korte CL, Serruys PW (2003): Inflammation and Atherosclerosis: Mechanisms Underlying Vulnerable Plaque.
Journal of Interventional Cardiology 16(2):107-113.

Kroemer G, Hirsch F, Gonzalez-Garcia A, Martinez C (1996): Differential involvement of Th1 and Th2 cytokines in autoimmune diseases. Autoimmunitiy 24(1):25-33.

Kronin V, Vremec D, Winkel K, Classon BJ, Miller RG, Mak TW, Shortman K, Süss G (1997): Are CD8+ dendritic cells (DC) veto cells? The role of CD8 on DC in DC development and in the regulation of CD4 and CD8 T cell responses.
International Immunology 9(7):1061-1064.

Kurts C (2002): Phenotypic and functional characterization of dendritic cells in the kidney. Nephrology Forum in Heidelberg.

Lane PJL, Brocker T (1999): Developmental regulation of dendritic cell function. Current Opinion in Immunology 11:308-313.

Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2000): Kinetic of dendritic cell activation: impact on priming Th1,Th2 and nonpolarized T cells. Nature Immunology 1(4):311-6.

Lanzavecchia A (1998): Licence to kill. Nature 393(4):413-14.

Lanzavecchia A (1999): Dendritic cell maturation and generation of immune responses. Haematologica 84(3):23-25.

Lanzavecchia A, Sallusto F (2000): Dynamics of T Lymphocyte responses. Intermediates, Effecors, and Memory Cells. Science 290:92-97.

Lanzavecchia A, Sallusto F (2000): From synapses to immunological memory: the role of sustained T-cell stimulation. Current Opinion of Immunology 12(1): 92-8.

Lanzavecchia A, Sallusto F (2001): The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. Current Opinion of Immunology 13:291-298.

Lanzavecchia A, Sallusto F (2001): Regulation of T Cell Immunity by Dendritic Cells. Cell 106(3):263-6.

Lanzavecchia A, Sallusto F (2001): Antigen decoding by T-lymphocytes: from synapses to fate determination. Nature Immunology 2(6):487-492.

Lanzavecchia A (2002): Lack of fair play in the T cell response.
Nature Immunology 3(1):9-10.

Lars J, Schuler G, Steinkasserer A (2001): Viral vectors for dendritic cell-based immuntherapy. Trends in Immunology 22(2):102-106.

Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, Schuler G, Steinkasserer A (2001): The Extracellular Domain of CD83 Inhibits Dendritic Cell-mediated T Cell Stimulation and binds to a Ligand on Dendritic Cells.
J Exp Med 194(12):1813-1821.

Lindert RB, Haase CG, Brehm U, Linington C, Wekerle H, Hohlfeld R (1999): Multiple Sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain to the myelin oligodendrocyte glycoprotein. Brain 122(Pt 11):2089-100.

Link H, Huang Y-M, Xiao B-G (1999): Dendritic cells in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis.
Journal of Neuroimmunology 100(1-2) 102-110.

Link H, Huang YM, Masterman T, Xiao B-G (2001): Vaccination with autologous dendritic cells: from experimental autoimmune encephalitis to multiple sclerosis.
Journal of Neurimmunology 114:1-7.

Lindhout E, Degroot C (1995): Follicular dendritc cells and apoptosis: Life and death in the germinal centre. Histochemical Journal 27(3):167-183.

Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K (1993): T cell spezific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. Eur J Immunol 23:1364-72.

Litzenburger T, Fässler R, Bauer J, Lassmann H, Linington C, Wekerle H, Iglesias A (1998): B Lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: Development and Function in Gene-targeted Transgenic Mice. J Exp Med 188(1):169-180.

Lucey DR (1999): Evolution of the type-1 (Th1)-type-2(Th2) cytokine paradigm. Infect Dis Clin North Am 13(1):1-9.

Manickan E, Kanangat S,Rouse RJD, Yu Z, Rouse BT (1996): Enhancement of immune response to naked DNA vaccine by immunization with transfected dendritic cells. Journal of Leukocyte Biology 61:125-132.

Matasic R, Dietz AB, Vuk-Pavlovic S (2001): Maturation of human dendritic cells as sulfasalazine target. Croat Med J 42(4):440-5.

McLellan AD, Starling GC, Hart DNJ (1995): Isolation of Human Blood dendritic cells by discontinuous Nycodenz gradient centrifugation. Journal of Immunological Methods 184:81-89.

Meinl E, Weber F, Drexler K, Morelle C, Ott M, Saruhan-Direskeneli G (1993): Myelin basic protein-spezific T lymphocyte repertoire in multiple sclerosis: complexity of the response and dominance of nested epitopes due to recruitment of multiple T cell clones. J Clin Invest 92:2633-43.

Morel PA, Oriss TB (1998): Crossregulation between Th1 and Th2 cells. Crit Rev Immunol 18(4):275-303.

Nakano H, Shinohara K (1994): X-Ray- Induced Cell Death: Apoptosis and Nekrosis. Radiation Research 140:1-9.

Naito Y (1998): Molecular mechanism of cytokine gene expression in Th1 and Th2. Rinsho Byori 46(9):900-7.

Nelson EL, Strobl S, Subleski J, Prieto D, Kopp WC, Nelson PJ (1999): Cycling of human dendritic cell effector phenotypes in response to TNF-α: modification of the current "maturation" paradigm and implications for in vivo immunoregulation. FASEB J 13:2021-2030.

Nijman HW, Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, Oorschot VMJ, Vierboom MPM, van de Keur M, Kenemans P, Kast WM, Geuze HJ, Melief CJM (1995): Antigen Capture and Major Histocompability Class II Compartments of Freshly Isolated and Cultured Human Blood Dendritic Cells. J Exp Med 182:163-174.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000): Multiple Sclerosis. New England Jounrnal of Medicine 343(13):928-952.

O´Garra A, Murphy K (1994): Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. Curr Opin Immunol 6(3):458-66.

Ortner U, Inaba K, Koch F, Heine M, Miwa M, Schuler G, Romani N (1996): An improved

isolation method for murine migratory cutaneous dendritic cells.
J of Immunol Methods 193:71-79.

Pashenkov M, Huang Y-M, Kostulas V, Haglund M, Söderström M, Link H (2001): Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid.
Brain 124 (Pt3):480-92.

Paty et al. (2002): The Lesions of Multiple Sclerosis. New England Jounrnal of Medicine 346(3):199.

Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stöckl J, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez, Knapp W (1996): Molecular and Functional Characteristics of Dendritic Cells Generated from Highly Purified CD14+ Peripheral Blood Monocytes.
The Journal of Immunology 157:3850-3859.

Poek, Hacke (1998): Neurologie, Springerverlag 10.Auflage.

Prahalad S (2000): Atopy, autoimmunity, and the TH1/TH2 balance. J Pediatr 137(4):446-9.

Puig-Kröger A, Reoso M, Fernandez-Capetillo O, Zubiaga A, Silva A, Bernabéu C, Corbi AL (2001): Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phentypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. Blood 98(7):2175-2182.

Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinmann RM, Muller WA (1999): Differentiation of Phagocytic Monocytes into Lymph Node Dendritic cells in Vivo.

Immunity 11:753-761.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ (1999): Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. Science. 19(283):1183-6

Robinson SP, Saraya K, Reid CDL (1997): Developmental aspekts of dendritic cells in vitro and in vivo. Leukemia and Lymphoma 29:477-90.

Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM (1994): Proliferating Dendritic Cell Progenitors in Humann Blood. J.Exp.Med. 180:83-93.

Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G (1996): Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. Journal of Immunological Methods 196:137-151.

Romagnani S (2000): T-cell subsets (Th1 versus Th2). Ann Allergy Asthma Immunol 85(1):9-18.

Rook GA, Hernandez-Pando R, Lightman SL (1994): Hormones, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. Immunol Today 15(7):301-3.

Rosenzweig M, Canque B, Gluckman JC (1996): Human dendritic cell differentiation Pathway from CD34+ Hemotopoietic precursor cells. Blood 87(2):535-544.

Roth R, Spiegelberg HL (1996): Activation of Cloned Human CD4+ Th1 and Th2 Cells by Blood Dendritc Cells. Scand J Immunol 43:646-651.

Sallusto F, Lanzavecchia A (2000): Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. Immunol Rev. 177:134-40.

Schmidt S, Linington C, Zipp F, Sotgiu S, de Waal Malefyt R, Wekerle H (1997): Multiple sclerosis: comarsion of the human T cell response to S100ß and myelin basic protein reveals parallels to rat experimental autoimmune panencephalitis. Brain 120:1437-45.

Schmidt S (1998): S100ß: Pathogenetische und pathophysiologische Bedeutung in der Neurologie. Nervenarzt 69:639-646.

Schultze JL, Machalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J, Delgado JC, Gribben JG, Nadler LM (1997): CD40-activated Human B Cells: An Alternative Source of Highly Efficient Antigen Presenting Cells to Generate Autologous Antigen-specific T Cells for Adoptive Immunotherapy. J Clin Invest 100(11):2757-2765.

Seder RA, Prussin C (1997): Are differentiated human T helper cells reversible? Int Arch Allergy Immunol 113(1-3):163-6.

Seema S, Mummidi S, Ahuja K (1998): Human Dendritic Cell-Based Anti-Infective Therapy. The American Association of Immnologists 54(7):560-5.

Stanulis ED, Jordan SD, Rosecrans JA, Holsapple MP (1997): Disruption of Th1/Th2 cytokine balance by cocaine is mediated by corticosterone.

Immunopharmacology 37(1):25-33.

Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH (1997): Induction of Tolerance by IL-10-Treated Dendritc Cells. The Journal of Immunology 159:4772-4780.

Steinman RM (1991): The Dendritic Cell System and its Role in Immunology. Annu Rev Immunol 9:271-96.

Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PG, Venaille TH, Proksch S, Holt PG (1998): Resting Respiratory Tract Dendritc Cells Preferentially Stimulate T Helper Cell Type 2 (Th2) Responses and Require Obligatory Cytokine Signals for Induction of Th1 Immunity. J Exp Med. 188(11):2019-2031.

Sun J, Link H, Olsson T, Xiao BG, Andersson G, Ekre HP, Linigton C, Diener P (1991): T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. The Journal of Immunology 146(5):1490-1495.

Takenaka H, Maruo S, Yamamoto N, Wysocka M, Ono S, Kobayashi M, Yagita H, Okumura K, Hamaoka T, Trinchieri G, Fujiwara H (1997): Regulation of T cell-dependent an – independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6 and IL-4. J Leukoc Biol 61:80-87.

Wekerle H (1995) Antigen presentation by central nervous system glia. Neuroglial Cells. New York: Oxford University Press:685-99.

Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C (1994): Animals models.

Ann Neurol 102:1265-73.

Wekerle H, Linington C, Lassmann H, Meyermann R (1986): Cellular immune reactivity within the CNS. Trends Neurosci 9:271-7.

Wucherpfennig KW, Weiner HL, Hafler DA (1991): T-cell recognition of myelin basic protein. Immunol Today 12:277-82.

Xiao B-G, Link H (1999): Antigen-specific T-cell in autoimmune disease with a focus on multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. CMLS 56(1-2):5-21.

Zhou LJ, Tedder TF (1996): CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. Proc Natl Acad Sci 93:2588-2592.

Zhou LJ, Tedder TF (1995): Human Blood Dendritic Cells selectively express CD83, a member of the Immunoglobin Superfamily.
The Journal of Immunology 154:3821-3835.

Zipp F, Kerschensteiner M, Dornmair K, Malotka J, Schmidt, S, Bender A, Giegerich G, de Waal Malefyt R, Wekerls H, Hohlfeld R (1998): Diversity of anti-T-cell receptor immune response and its implications for T-cell vaccination therapy of multiple sclerosis. Brain 121:1395-1407.

Zou W, Borvak J, Marches F, Wie S, Galanaud P, Emilie D, Cuiel TJ (2000): Macrophage-derived Dendritic Cells have strong Th1-polarizing potential mediated by ß-chemokines rather than IL-12. The Journal of Immunology 165:4388-4395.

8. ANHANG

8.1 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Thomas Nickel
Adresse:	Hackländerstr.2 81677 München
Telefon:	089 – 929 4457
E-mail:	tsnickel@web.de
Geburtstag:	5.11.72
Geburtsort:	München
Familienstand:	ledig

Schule und Studium:

Aug. 1979 – Juni 1983:	Grundschule Pöcking bei Starnberg
Aug. 1983 – Sep. 1985:	Gymnasium Starnberg
Sep. 1985 – Mai 1993:	Nymphenburger Gymnasium in München Abitur mit der Note 1,4
Okt.1993 – Nov. 2000:	Medizinstudium an der Technischen Universität in München Abschluß mit der Note 2
	Praktisches Jahr: 1. Tertial: Neurologie Klinikum rechts der Isar 2. Tertial: Gastroenterologie Klinikum rechts der Isar Stat. 2/6 Kardiologie Deutsches Herzzentrum Stat.2/11 3. Tertial: Chirurgie Krankenhaus Bogenhausen
Seit Okt 1996	experimentelle Promotionsarbeit: Im Institut für klinische Neuroimmunologie der LMU,Vorstand Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld und dem Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried Abteilung Neuroimmunologie, Leiter Prof. Dr. Hartmut Wekerle zu Thema: Untersuchungen zur Isolierung und Anwendung humaner Monozyten generierter Dendritischer Zellen zur Restimulation antigenspezifischer Langzeit-T-Zelllinien am Beispiel der Multiplen Sklerose
Feb. – Mail 1999	Stipendium: der Technischen Universität München für die Cornell Universität in NY; Kurse und Praktika in den Fächern Notfallmedizin, Infektiologie, Kardiologie
	Famulaturen:
Aug. 1996	Pathologie im Krankenhaus rechts der Isar in München
Okt. 1996	Internistische Abteilung des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder in München
Aug. 1997	Radiologie im Krankenhaus rechts der Isar in München
Sept. 1997	Neurologie im Krankenhaus rechts der Isar in München

Okt. 1997	Gastro-Enterologische Abteilung der Universitätsklinik Tel-Aviv, Israel
Aug. 1998	HNO-Praxisfamulatur in München
Sept. 1998	Internistische Abteilung des Deutschen Herzzentrums München
	Medizinische Nebentätigkeiten an der Universität:
1994 - 1995:	Teilnahme an einem erweiterten Erste Hilfe Kurs
Mai1998 - Jan.1999:	Tätigkeit als studentische Aushilfe in der Pädiatrischen Ambulanz des Krankenhauses München Schwabing
Juli - Aug.1998:	Betreuung einer Studie in einer Gastroenterologischen Praxis

AiP:

Seit 1.12.2000	Poliklinik der Ludwig-Maximillian-Universität:
Dez.2000 - Aug.2001	Station II, Normalstation mit 10 Normal- und 3 Überwachungsbetten
Aug.2001 - Okt.2001	Allgemein- und hämatologisch-/onkologische Ambulanz
Okt.2001 - Mai.2002	Angiologische Ambulanz

Assistenzarzt:

Aug. 2002 - Okt.2002	Transplantationsstation der Nephrologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main
Nov. 2002 bis dato:	1. Medizinische Klinik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximillian-Universität
Nov. 2002 – Jan.2004	Dialysestation F11 mit nephrologischer Ambulanz
Feb.2004 bis dato	kardiologische Allgemein-Station F6b Forschungsgebiet: Arbeitsgruppe PD Dr.Weis zum Thema Dendritische Zellen und Arteriosklerose

Sonstige Kenntnisse und Aktivitäten:

Stipendium:	Stipendiat der Hanns-Seidel-Stiftung seit 1994
Hobbies:	Literatur, Politik, Sport
Sprachen:	Englisch aktiv und passiv

8.2 Eigene Veröffentlichungen

Kofler S, Nickel T, Weis M (2004): The role of cytokines in cardiovascular diseases. Focus on endothelial response to inflammation. Clin Sci (Lond). 12:1-27.

Schlichting C, Nickel T, Weis M (2005 in Press): Dendritic cells as pharmacological targets for generation of regultory immunsuppressive effectors. Curr Med Chem.