

Immunmodulatorische Wirkung von Cladribin und Laquinimod auf Dendritische Zellen in der Behandlung von Multipler Sklerose

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“
(Doctor rerum naturalium)

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

vorgelegt durch

Stefan Hans-Peter Kraus

geboren in Koblenz

Mainz, 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Vorsitz:

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2017

Für Angelika

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, die Wirkung der Medikamente Cladribin und Laquinimod auf Dendritische Zellen (DCs) näher zu klären. Beide Medikamente wurden in mehreren Phase III-Studien zur immunmodulatorischen Behandlung der Multiplen Sklerose untersucht und befinden sich im Zulassungsprozess durch die Arzneimittelagenturen. Einer möglichen Wirkung auf Dendritische Zellen als zentrale Akteure im Immunsystem soll hier nachgegangen werden.

Im Zuge der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass Cladribin positiv auf die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 und auf MHC II Moleküle im murinen und humanen Modellsystem wirkte. Des weiteren wurde auch die Sekretion von Chemokinen beeinflusst. So sezernierten murine DCs weniger MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-1. Humane DCs sezernierten weniger MIP-1 α , MIP-1 β und MIG. Ferner erniedrigte Cladribin die Sekretion der Zytokine TNF- α und IL-1 β bei murinen und humanen DCs. Beide Zytokine wirken proinflammatorisch, sodass hier ein immunmodulatorischer Effekt von Cladribin auf DCs nachgewiesen werden konnte. Funktional konnte gezeigt werden, dass die Anlockung von CD14⁺ Monozyten durch DCs signifikant verringert wurde und dass murine DCs naive T-Zellen eher zu T_H17 Zellen polarisierten.

Für Laquinimod konnte *in vitro* gezeigt werden, dass murine DCs weniger MIP-1 α und humane DCs weniger MIP-1 α , MIP-1 β und MIG ins Kulturmedium abgaben. DCs, die aus Laquinimod-behandelten Patienten isoliert wurden, sezernierten ebenfalls weniger MIP-1 α , MIP-1 β . Dieser immunmodulatorische Effekt konnte *ex vivo* bereits auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die chemoattraktive Kapazität der behandelten DCs auf CD14⁺ Monozyten *in vitro* war nachweislich geringer. Ferner beeinträchtigte Laquinimod die Expression von Oberflächenmolekülen, indem es die Expression von CD1c auf konventionellen DCs *ex vivo* beim Menschen signifikant erniedrigte und die Expression von CD86 auf humanen CD1c⁺ DCs und murinen DCs erhöhte. Außerdem erhöhte Laquinimod die Expression des Rezeptors IL-1R2 in murinen DCs, der IL-1 β bindet, jedoch keine Signaltransduktionskaskade nach sich zieht. Als mögliche Ursache für die Wirkung von Laquinimod konnte die Beeinträchtigung des NF- κ B Signaltransduktionswegs in murinen DCs durch Laquinimod mittels Genexpressionsanalyse nachgewiesen werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Das Immunsystem	5
1.2	Pathogenese der MS	5
1.2.1	T-Zellen	7
1.2.2	DCs	12
1.2.3	B-Zellen	16
1.3	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis – das Tiermodell der MS	17
1.4	Cladribin – ein Zytostaticum	19
1.5	Laquinimod – oraler Immunmodulator	22
2	Material und Methoden	25
2.1	Materialliste	25
2.2	Chemikalien	26
2.3	Tierstämme	28
2.4	Induktion und Untersuchung einer aktiven experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis	29
2.5	In vivo Assay zur T-Zell Proliferation und T-Zell Differenzierung	29
2.6	Durchflusszytometrie	30
2.7	Isolation von DCs aus der Milz	30
2.8	Isolation von T-Zellen aus dem zentralen Nervensystem	30
2.9	Kultivierung muriner knochenmarkstämmiger DCs	31
2.10	Kultivierung humaner DCs	31
2.11	Experimente zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von DCs	32
2.12	CFSE-Färbung zur Bestimmung der Proliferation DCs	32
2.13	T-Zell – Proliferationsassay	33

2.14	Aktivierung muriner naiver T-Zellen durch knochenmark-stämmige DCs	33
2.15	Aktivierung humaner naiver T-Zellen durch allogene DCs	33
2.16	Aktivierung polyklonaler MBP ₈₅₋₉₉ -spezifischer T-Zellen durch autologe DCs.....	34
2.17	Nachweis von Zytokinen und Chemokinen in Kulturüberständen	34
2.18	Migrationsversuche von humanen Monozyten.....	35
2.19	Phagozytoseverhalten immaturer DCs	35
2.20	Analyse von DCs aus peripherem humanem Blut.....	35
2.21	Durchflusszytometrische Analyse von Untergruppen humaner DCs	36
2.22	RNA-Extraktion und quantitative Polymerasekettenreaktion	36
2.23	Statistische Analyse.....	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Wirkung von Cladribin auf DCs	39
3.1.1	Cladribin zeigt keinen akut toxischen Effekt auf DCs in vitro in nanomolaren Konzentrationen	39
3.1.2	Cladribin verringert die Phagozytose von immaturen DCs.....	41
3.1.3	Das Zusammenspiel zweier Enzyme steuert die Toxizität von Cladribin.....	41
3.1.4	Cladribin greift nicht in den Differenzierungsprozess DCs ein	43
3.1.5	Cladribin verändert die Oberflächenmoleküle von DCs in vitro	43
3.1.6	Cladribin verändert die T-Zell polarisierende Funktion von DCs	45
3.1.7	Die Zytokin- und Chemokinsekretion von maturen DCs wird durch Cladribin beeinträchtigt.....	47
3.2	Wirkung von Laquinimod auf DCs.....	49
3.2.1	Laquinimod wirkt inhibierend auf die T-Zellproliferation	49
3.2.2	Laquinimod hat Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung	50
3.2.3	Laquinimod zeigt keinen toxischen Effekt bei therapeutischen Dosierungen in vitro	51
3.2.4	Laquinimod ändert Subpopulationen von murinen DCs in vivo	52

3.2.5	Laquinimod verändert die Zytokin- und Chemokinproduktion in konventionellen DC und beeinflusst die Migration von Monozyten	53
3.2.6	Laquinimod verändert die Zytokin- und Chemokinproduktion in vivo und erniedrigt den Anteil CD1c ⁺ DCs und plasmazytoider DCs im Blut	55
3.2.7	Der biologische Effekt von Laquinimod wird durch die Inhibition des NF-κB Signaltransduktionswegs in murinen und humanen DCs vermittelt	59
4	Diskussion	63
4.1	Wirkung von Cladribin auf DCs	63
4.1.1	Wirkung von Cladribin auf das Überleben von DCs in vitro	63
4.1.2	Cladribin verändert den Phänotyp maturer DCs	64
4.1.3	Cladribin verringert die Chemokin- und Zytokinproduktion von DCs	65
4.1.4	Cladribin verändert die T-Zell polarisierende Funktion von DCs	67
4.2	Wirkung von Laquinimod auf DCs	68
4.2.1	Laquinimod verändert die Chemokinproduktion der DCs	69
4.2.2	Laquinimod verändert die Zahlenverhältnisse der DC-Subsets	70
4.2.3	Laquinimod wirkt auf DCs durch die Veränderung des NF-κB Signaltransduktionswegs	72
4.2.4	Laquinimod verringert die Stimulation von T-Zellen durch DCs	74
5	Anhang	77
5.1	Abbildungsverzeichnis	77
5.2	Abkürzungen	78
5.3	Veröffentlichungen	81
5.4	Danksagung	83
5.5	Literaturverzeichnis	84
5.6	Lebenslauf	96

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Vertebraten lässt sich im Wesentlichen in zwei Teile unterteilen: (a) das System der angeborenen Immunität und (b) das System der erworbenen Immunität. Zur angeborenen Immunität gehören Effektormechanismen, wie das Komplementsystem, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, sowie Mastzellen und Dendritische Zellen (DCs). Sie alle haben gemeinsam, dass sie über bestimmte, in der Ontogenese festgelegte Rezeptoren, Pathogene erkennen und diese bekämpfen können. Die erworbene Immunität wird dagegen vornehmlich von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten vermittelt, wobei auch DCs maßgeblich beteiligt sind. Die Besonderheit hierbei liegt darin, dass das Rezeptor-Repertoire von T- und B-Lymphozyten nicht keimbahncodiert festgelegt ist. Vielmehr ist durch das Vorhandensein vieler Genloci und darin liegenden Gensegmenten eine enorme Rezeptorvarianz möglich. Vor allem die mögliche Vielfalt der Rezeptoren und die damit verbundene Spezifität versprechen großen Erfolg im Kampf des Immunsystems gegen immer neue und sich schnell verändernde Pathogene.

Im Folgenden sollen die Teile des Immunsystems näher betrachtet werden, die im Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose (MS) eine wichtige Rolle spielen.

1.2 Pathogenese der MS

MS ist eine autoimmune Erkrankung, bei der – allgemein gesprochen – das Immunsystem des Patienten die Fähigkeit verliert, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Genauer betrachtet, spaltet sich die Pathogenese in zwei Phasen: in der ersten Phase kommt es zu einer autoimmunen Entzündungsreaktion. Daraus entwickelt sich in der Folge ein beständiger, neurodegenerativer Prozess (Steinman, 2001). Zentraler Punkt aller aktuellen Theorien über die Entstehung von MS sind CD4⁺ T-Zellen. Einen großen Fortschritt in der Erforschung der MS brachten Experimente, bei denen im murinen Modellsystem der Krankheitsverlauf induziert werden konnte. Dieses Modell der MS nennt man experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE).

Im ersten Schritt, der Initiationsphase von MS, werden CD4⁺ T-Zellen durch die Präsentation von Autoantigenen, wie zum Beispiel Bruchstücken von Myelin, auf *major histocompatibility*

complex (MHC) II-Molekülen von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aktiviert. Nach der Aktivierung durch APCs beginnen die CD4⁺ T-Zellen zu proliferieren und sich in proinflammatorische Effektorzellen zu differenzieren. Zwei Effektorzelltypen können für die weitere Pathogenese verantwortlich gemacht werden: T_H1 und T_H17 Zellen. Diese Zelltypen können hauptsächlich durch die von ihnen produzierten Cytokinen unterschieden werden. So produzieren T_H1 Zellen Interferon- γ (IFN- γ), wohingegen T_H17 Zellen charakteristischerweise Interleukin-17 (IL-17) sezernieren (Lovett-Racke, Yang, & Racke, 2011). Das während der Aktivierung vorherrschende Cytokin-Milieu entscheidet darüber, ob sich aus den naiven CD4⁺ T-Zellen T_H1 oder T_H17 Zellen entwickeln. So konnte gezeigt werden, dass IFN- γ und IL-12 die Entwicklung von T_H1 Zellen, die Cytokine *Transforming growth factor* (TGF)- β und IL-6 die Entwicklung von T_H17 Zellen begünstigen (Petermann & Korn, 2011). Interessanterweise konnten immense Anstrengungen, die von den APCs präsentierten Autoantigene zu identifizieren, bisher noch kein endgültiges Ergebnis aufzeigen. Eine aktuelle Untersuchung konnte zeigen, dass der einwärtsgerichtete Kalium-Kanal 4.1 (K_{ir}4.1) ein mögliches Antigen sein könnte (Srivastava et al., 2012). Hauptsächlich konzentriert sich die Forschung auf Myelin-Proteine oder sowie Moleküle im Bereich der axoglialen Verbindungsstrukturen (Dhaunchak et al., 2012).

Im weiteren Verlauf werden die aktivierten, autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen durch Chemokine, wie beispielsweise *C-C motif ligand* (CCL) 2 und CCL5 zu Entzündungsherden im zentralen Nervensystem (ZNS) gelockt. Durch Interaktion mit Adhäsionsmolekülen auf ihrer Zelloberfläche, wie *very late antigen-4* (VLA-4) (Coles et al.), und *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 auf den Endothelzellen, gelingt es den CD4⁺ T-Zellen, die Bluthirnschranke zu passieren (Engelhardt & Ransohoff, 2005). Neueste Forschungen konnten zeigen, dass auch die Moleküle P-Selektinlykoproteinligand (PSGL) -1 und *myeloma cell adhesion molecule* (MCAM) auf T-Zellen mit den Endothelzellen interagieren und die Migration durch das Endothel fördern (Schneider-Hohendorf et al., 2014). Im perivaskulären Raum angekommen, werden die autoreaktiven T-Zellen aufs Neue durch APCs reaktiviert und infiltrieren das Hirnparenchym (Greter et al., 2005).

Dabei aktivieren und rekrutieren sie viele andere Effektor-T-Zellen und APCs, wie Makrophagen, B-Zellen und DCs (DC) im Gehirn. Hierdurch wird das ZNS-Gewebe massiv durch die Bildung von *reactive oxygen species* (ROS), Glutamat-induzierte Exzitotoxizität und

proinflammatorische Cytokine durch CD4⁺ T-Zellen, cytotoxische CD8⁺ T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und aktivierte Mikroglia beschädigt (Herz, Zipp, & Siffrin, 2010). Aber nicht nur durch die zelluläre Immunantwort, sondern auch durch die Aktivierung des Komplementsystems entsteht großer axonaler Schaden. Die hierdurch in Gang gebrachte Entzündungsreaktion, die ursprünglich gegen Myelinscheide, Axone und Neurone gerichtet war, führt nun zu Demyelinisierung, Schäden an den Axonen und dem Absterben von Oligodendrozyten und Neuronen.

Im Folgenden sollen die Zellpopulationen des Immunsystems näher betrachtet werden, die für die Entstehung und Entwicklung von MS hauptsächlich verantwortlich sind. Namentlich sind dies T-Zellen, DCs und B-Zellen.

1.2.1 T-Zellen

T-Zellen entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Ihre weitere Differenzierung läuft aber nicht im Knochenmark sondern im Thymus ab. Dort wird die Antigenpezifität ihres T-Zellrezeptors getestet. Prinzipiell werden im Zuge dessen autoreaktive T-Zellen durch Apoptose aussortiert. Jedoch passieren einige potentiell autoreaktive T-Zellen diesen Selektionsprozess und gelangen als naive T-Zellen aus dem Thymus in den Körper.

Durch den speziellen T-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche sind T-Zellen in der Lage, Antigene zu erkennen. Bindet das spezifische Antigen, präsentiert auf einem MHC-Molekül einer APC, an den T-Zellrezeptor und bindet gleichzeitig der Kofaktor CD28 an ein kostimulatorisches B7-Molekül auf der APC, so wird die naive T-Zelle aktiviert. Nach dieser Aktivierung beginnt die T-Zelle innerhalb von wenigen Stunden zu proliferieren und sich zur Effektor-T-Zelle zu differenzieren. (Gonzalo et al., 2001; van der Merwe & Davis, 2003). Im Folgenden synthetisiert die T-Zelle IL-2 und exprimiert den hochaffinen IL-2 Rezeptor (CD25). Dies führt zu einer autokrinen Stimulation der T-Zelle und zur weiteren Proliferation. Durch die starke Proliferation entstehen in kürzester Zeit viele Klone der ursprünglichen naiven T-Zelle, die den spezifischen T-Zellrezeptor tragen. Im weiteren Verlauf ändern die Effektor-T-Zellen die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und die Glykosylierung vieler Oberflächenmoleküle, wodurch sie in die Lage versetzt werden, aus den Lymphknoten zu den Entzündungsherden im ZNS zu migrieren.

Von der Funktion her lassen sich zwei Populationen von T-Zellen unterscheiden: CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Dies fand Mitte der 1970er Jahre eine Arbeitsgruppe um Charles A. J. JANEWAY heraus (Janeway, Sharrow, & Simpson, 1975). Diese unterscheiden sich hauptsächlich in den von ihnen erkannten MHC-Molekülen. CD4⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die auf MHC II Molekülen präsentiert werden (Lanzavecchia, Ferrarini, & Celada, 1982). CD8⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die ihnen auf MHC I Molekülen präsentiert werden (X. C. Li & Raghavan, 2010; Rudolph, Stanfield, & Wilson, 2006). Man spricht hier von einer Restriktion: CD4⁺ T-Zellen beschränken sich auf MHC II Expression, CD8⁺ T-Zellen beschränken sich auf MHC I Expression. Ob sich aus Thymozyten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen entwickeln, wird im Thymus bei der Interaktion mit MHC I und MHC II Molekülen festgelegt (Ignatowicz, Kappler, & Marrack, 1996; von Boehmer et al., 1989; Zerrahn, Held, & Raulet, 1997).

1.2.1.1 CD4⁺ T-Zellen

Hauptaufgabe der CD4⁺ T-Zellen ist es, die Immunantwort zu koordinieren. So können CD4⁺ T-Helferzellen der T_H2-Population mit B-Zellen interagieren und die humorale Immunantwort in Gang setzen. Für den Verlauf von MS sind CD4⁺ T_H1, T_H2 und T_H17-Zellen entscheidend. Ebenso bestimmen regulatorische T-Zellen (T_{reg}) den Verlauf von MS. Über die genaue Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu bestimmten T-Helferzellpopulationen entscheidet das während der Aktivierung vorherrschende Cytokinmilieu. So führt die Sekretion von IL-12 durch Makrophagen, IFN- γ durch *natural killer* (NK)-Zellen und CD8⁺ cytotoxische T-Zellen zur Ausprägung des T_H1-Phänotyps. Die Differenzierung zu T_H1-Zellen wird maßgeblich von einem Transkriptionsfaktor bestimmt: T-bet (Szabo et al., 2000). T_H1-Zellen sezernieren IFN- γ , *tumor necrosis factor* (TNF)- α und IL-2. Sie aktivieren vornehmlich Makrophagen und initiieren die zelluläre Immunantwort. Diese Immunantwort hilft bei der Bekämpfung intrazellulärer Bakterien und viralen Infektionen. Indem Makrophagen aktiviert werden, steigt die Präsentation von Antigenen, wodurch CD8⁺ cytotoxische T-Zellen zur Proliferation aktiviert werden (Seder, Gazzinelli, Sher, & Paul, 1993).

Im Gegensatz dazu führt das Vorherrschen von IL-4 während der Aktivierung naiver T-Zellen zu T_H2-Zellen und einer humoralen Immunantwort. Die Entwicklung zu T_H2-Zellen kann durch IL-6 sogar noch verstärkt werden. Nach der Aktivierung leitet der Transkriptionsfaktor GATA-3 die Entwicklung der aktivierten T-Zelle zu einer T_H2-Zelle, die *transforming growth factor* (TGF)- β , IL-4, IL-5 und IL-10 sezerniert und in der Lage ist, B-Zellen zur Freisetzung

neutralisierender Antikörper zu veranlassen (T. Hofer, Nathansen, Lohning, Radbruch, & Heinrich, 2002). Die Aktivierung von B-Zellen, was zur Produktion von spezifischen Antikörpern führt, läuft nach einem bestimmten Muster ab und wird als T-B-Zellkollaboration bezeichnet. Durch die Erkennung ihres Antigens auf dem MHC II-Molekül der B-Zelle beginnt die T_H2-Zelle damit, Zytokine zu bilden und zu sezernieren. Außerdem erhöhen beide Zellen die Expression weiterer kostimulatorischer Moleküle. Diese kostimulatorischen Signale wirken dann gemeinsam mit den Cytokinen auf die B-Zelle ein, was zur Proliferation und zum Klassenwechsel der Immunglobuline der B-Zelle führt (Bernard, Coitot, Bremont, & Bernard, 2005; Mitchison, 2004). Außerdem können T_H2-Zellen eosinophile Granulozyten und Mastzellen aktivieren.

T_H17-Zellen, die maßgeblich an der Pathogenese des Tiermodells der MS beteiligt sind, sind charakterisierbar anhand ihrer Produktion von IL-17. Diese Subpopulation von T-Zellen hat den Transkriptionsfaktor ROR γ T gemein (Ivanov et al., 2006). T_H17-Zellen sind, genau wie T_H1-Zellen, proinflammatorische Zellen. Die Zytokine TGF- β und IL-6 können in der Maus die Entwicklung von T_H17-Zellen induzieren (Veldhoen, Hocking, Atkins, Locksley, & Stockinger, 2006). IL-23 kann T_H17-Zellen zur Expansion anregen. Dieses Zytokin ist ein Heterodimer und besteht aus einer p19 und einer p40 Untereinheit. Die p40 Untereinheit ist identisch mit der, die auch in IL-12 und IL-23 vorkommt (Aggarwal, Ghilardi, Xie, de Sauvage, & Gurney, 2003). Beim Menschen induzieren IL-6, IL-23 und IL-1 β die Entwicklung von T_H17-Zellen, wobei IL-1 β essenziell ist (Zielinski et al., 2012). Interessanterweise können Zytokine der Subpopulationen T_H1 und T_H2 die Differenzierung in T_H17-Zellen hemmen. Im wissenschaftlichen Feld wird kontrovers diskutiert, ob T_H1-Zellen die Subpopulation sind, die hauptsächlich Autoimmunität verursacht. Es finden sich ebenso einschlägige Hinweise darauf, dass die T_H17-Zellen die entscheidende Zellpopulation bei der Entstehung von MS sind. Dies konnte vor allem für das murine Modell der MS, für die EAE, gezeigt werden (Steinman, 2007). So sind Mäuse, die kein IL-23 produzieren können, nicht anfällig für die Entwicklung von EAE, wohingegen Mäuse mit einem Defekt in IL-12p35 oder IFN- γ eine EAE entwickeln können (Gran et al., 2002). Aber auch in humanen Studien mit MS-Patienten kommen immer mehr Beweise auf, dass die IL-17 produzierenden CD4⁺ T-Zellen ursächlich für die Entwicklung einer Entzündungsreaktion sind. So kann IL-17 mRNA vermehrt im Blut, CSF und Hirngewebe von MS-Patienten nachgewiesen werden (Luchtman, Ellwardt, Larochelle, & Zipp, 2014; Matusevicius et al., 1999). Indirekt kann auf eine erhöhte T_H17-Expansion in MS-Patienten

geschlossen werden, da die Produktion von IL-23 durch myeloide DCs (mDC) in MS-Patienten deutlich höher ist, als in gesunden Kontrollpersonen. Dadurch kann auf eine stärkere Proliferation von T_H17 -Zellen in MS-Patienten geschlossen werden (Vaknin-Dembinsky, Balashov, & Weiner, 2006). Zudem haben Untersuchungen von Hirngewebe gezeigt, dass IL-23p19 sowohl in aktiven als auch in chronischen Läsionen des Gehirns von MS-Patienten nachgewiesen werden kann. Hieraus kann geschlossen werden, dass IL-23 eine besondere Rolle bei der Immunantwort spielt und dadurch das Risiko eines Gewebeschadens im Gehirn erhöht (Y. Li et al., 2007). Tzartos et al. konnten nachweisen, dass T_H17 -Zellen vermehrt in MS-Läsionen vorkommen (Tzartos et al., 2008). T_H17 -Zellen kommt aber sicher nicht die alleinige Schuld bei der Entwicklung einer EAE zu (Steinman, 2008). Durch adoptiven Transfer von entweder T_H1 - oder T_H17 -Zellen in Mäuse konnten Kroenke *et al.* zeigen, dass beide Subpopulationen eine EAE induzieren und bei den untersuchten Mäusen klinische Krankheitssymptome verursachen. Interessanterweise konnte jedoch festgestellt werden, dass sich die Pathologie von T_H17 -Zellen deutlich von der durch T_H1 -Zellen hervorgerufenen Gewebeschäden unterscheidet (Kroenke, Carlson, Andjelkovic, & Segal, 2008). Neue Untersuchungsergebnisse zeigen, dass nicht nur T_H17 -Zellen Hauptverursacher von MS sein können. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass weder die Überexpression von IL-17 noch die vollkommene Depletion von IL-17 einen größeren Einfluss auf die Entwicklung einer EAE haben (Haak et al., 2009). Zudem spielt GM-CSF ebenfalls eine wichtige Rolle (El-Behi et al., 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Applikation von IFN- γ den Krankheitsverlauf bei MS-Patienten verschlechtert (Panitch, Hirsch, Schindler, & Johnson, 1987).

1.2.1.2 $CD8^+$ T-Zellen

$CD8^+$ T-Zellen erkennen Antigene, die an MHC I-Moleküle gebunden sind. Die Wege, wie Antigene an MHC-Moleküle gebunden werden, um später auf der Zelloberfläche präsentiert zu werden, unterscheiden sich für MHC I und MHC II. Weiterhin unterscheiden sich beide Moleküle auch grundlegend in ihrer Verbreitung. Während alle Körperzellen MHC I-Moleküle besitzen, kommen MHC II-Moleküle nur auf bestimmten Zellen vor. Diese werden in der Gruppe der APC zusammengefasst. Während Antigene, die auf MHC II-Molekülen präsentiert werden, durch die präsentierende Zelle aktiv aufgenommen wurden, in Endosomen prozessiert und an MHC II Moleküle gebunden wurden (Rocha & Neefjes, 2008), werden auf MHC I-Molekülen Peptide präsentiert, die ihren Ursprung in der Zelle haben (Bjorkman et al.,

1987; Rotzschke et al., 1990). In allen Körperzellen werden durch Ubiquitin markierte Proteine im Proteasom abgebaut. Peptidfragmente werden dann durch das Tapasin-assoziierte Protein (Singh, Chittappen, et al.) ins Lumen des Endoplasmatischen Reticulums geschleust. Dort werden die Peptidfragmente an MHC I-Moleküle gebunden, das MHC-Molekül wird fertig gefaltet und in einem Vesikel zur Zelloberfläche transportiert, wo es später präsentiert wird (Groettrup, Soza, Kuckelkorn, & Kloetzel, 1996; Momburg, Neefjes, & Hammerling, 1994; Pierre & Mellman, 1998). Dieser Prozessierungsweg ist eminent wichtig für die Abwehr von viralen Infektionen oder intrazellulären Pathogenen. Bei solchen Infektionen und Pathogenen kann das Immunsystem den Befall nicht direkt feststellen, da sich die Viren und Pathogene in den körpereigenen Zellen aufhalten. Vielmehr ist das Immunsystem darauf angewiesen, den Befall durch Änderungen auf der Zelloberfläche zu erkennen. Durch die oben genannte Prozessierung wird es dem Immunsystem möglich, auf MHC I-Molekülen fremde Antigene von Viren oder intrazellulären Pathogenen zu erkennen und die befallenen Zellen zu zerstören. Erkennt ein zytotoxischer T-Lymphozyt (CTL) sein spezifisches Antigen auf einem MHC I-Molekül einer anderen Zelle, so kann er die Apoptose oder Nekrose dieser Zelle veranlassen. Dazu gibt es verschiedene Wege. Zum Beispiel kann der CTL spezielle Enzyme in Granula abschnüren, die die Hülle der Zielzelle zerstören und die Zielzelle zur Nekrose führen. Ein wichtiges Protein, das zwar keine enzymatische Aktivität besitzt, trotzdem aber zum Absterben von Zielzellen führt, ist das Perforin. Durch die Zusammenlagerung von 12-18 Perforin-Molekülen in der Zellmembran der Zielzelle entsteht ein Loch. Dadurch wird die zelluläre Integrität zerstört, was zum Absterben der Zielzelle führt (Podack et al., 1988; Zhou, Ou, Huang, & Moskophidis, 2002). Des Weiteren sind drei Serinproteasen bekannt, die sogenannten Granzyme, die durch die Perforation der Zelle mit Perforin in die Zelle eindringen können und über die Aktivierung einer Enzymkaskade zum Tod der Zelle führen können (Henkart, 1985). Ein weiterer Weg, durch den aktivierte CD8⁺ T-Zellen Zielzellen zerstören können, wird durch das Molekül Fas-Ligand (FasL) beschriftet. Dieses Protein wird von aktivierten CTLs auf ihrer Oberfläche exprimiert und kann mit dem Protein Fas, das auf den meisten Körperzellen exprimiert wird, interagieren. Auf der zytosolischen Seite der Zielzelle wird eine Kaskade verschiedener Proteine in Gang gesetzt, die schließlich zur Aktivierung einer DNase führt, die das Kerngenom in Stücke zerkleinert. Die Zelle ist damit nicht mehr lebensfähig und stirbt ab (Apoptose) (Barry & Bleackley, 2002; Chavez-Galan, Arenas-Del

Angel, Zenteno, Chavez, & Lascurain, 2009; Kagi, Ledermann, Burki, Zinkernagel, & Hengartner, 1996; Nagata, 1996; Nagata & Golstein, 1995).

Auch wenn weithin anerkannt ist, dass es $CD4^+$ T-Zellen sind, die MS verursachen, so kann der Einfluss von $CD8^+$ T-Zellen nicht außer Acht gelassen werden. So kann im Hirngewebe das Vorhandensein von $CD8^+$ T-Zellen in perivaskulären Regionen als auch an den Läsionsrändern nachgewiesen werden (Traugott, Reinherz, & Raine, 1983). In Läsionen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass $CD8^+$ T-Zellen klonal expandieren. Dies war anhand von Untersuchungen der entsprechenden T-Zellrezeptoren erkannt worden (Babbe et al., 2000). Des Weiteren steht eine Untergruppe von $CD8^+$ T-Zellen, die CD161 und einen T-Zellrezeptor mit TRAV 1-2 als invariante $V\alpha 7.2$ -Kette exprimieren, in Verbindung mit Läsionen im Gehirn von MS-Patienten. Diese sogenannten MAIT-Zellen (**M**ucus-assozierte **i**nvariante **T**-Zellen) treten vermehrt in aktiven Läsionen auf (Held, Beltran, Moser, Hohlfeld, & Dornmair, 2015; Held, Bhonsle-Deeng, et al., 2015). Das Bild könnte insofern passen, als $CD4^+$ T-Zellen die Entzündungsreaktion initiieren und dadurch die Bildung von Läsionen verursachen. $CD8^+$ T-Zellen könnten dann eine Vergrößerung der Läsion zur Folge haben. Diese Hypothese wird unterstützt durch zwei Veröffentlichungen, die zeigen, dass $CD8^+$ T-Zellen direkten Kontakt mit Axonen aufnehmen und diese beschädigen können (Kuhlmann, Lingfeld, Bitsch, Schuchardt, & Bruck, 2002; Medana, Martinic, Wekerle, & Neumann, 2001).

1.2.2 DCs

DCs werden als professionelle APCs bezeichnet, weil sie – genau wie Makrophagen und B-Zellen, in der Lage sind, fremde Antigene an MHC II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. In einer Hinsicht sind DCs aber einzigartig: sie können naive T-Zellen aktivieren und durch Endozytose aufgenommene Antigene sowohl auf MHC II- als auch an MHC I-Molekülen präsentieren. Dies nennt man Kreuzpräsentation (Banchereau & Steinman, 1998). Aufgrund ihrer Heterogenität ist es schwierig, eine sinnvolle Einteilung der DCs zu unternehmen. Historisch hat sich die Einteilung in myeloide DCs (mDC) und plasmazytoide DC (pDC) etabliert. Diese Einteilung beruht auf der Ontogenese dieser DC-Populationen. So zeigten frühe Experimente, dass mDCs scheinbar von myeloiden Vorläuferzellen abstammten und sich pDCs in der Hämatopoese von lymphoiden Vorläuferzellen her entwickelt hatten. Die Vielschichtigkeit der Entwicklung der vielen unterschiedlichen DC-Subpopulationen widerspricht jedoch weitgehend dieser alten Einteilung (Shortman & Liu, 2002).

Phänotypische Untersuchungen versuchen, Ordnung in die mannigfaltigen Subpopulationen zu bringen. Bisher konnte sich aber noch keine neue Einteilung der DC-Subpopulationen durchsetzen. Die führenden DC-Wissenschaftler sind von einer einheitlichen Ordnung noch weit entfernt. Shortman *et al.* schlagen beispielsweise die folgende Einteilung vor (Shortman & Liu, 2002):

CD11c⁺ CD11b⁻ CD45RO^{low}, die hauptsächlich im menschlichen Thymus zu finden sind und den lymphoiden DCs (=pDCs) am nächsten kommen

CD11c⁺ CD11b⁺ CD45RO^{high}, die ausschließlich im Thymus vorkommen und viele Marker der myeloiden DCs (=mDC) tragen

CLA⁺ CD1a⁺ Langerin^{high}, die in den dränierenden Lymphknoten der Haut vorkommen und den Langerhanszellen entsprechen.

Demgegenüber stellen Wan *et al.* ein differenzierteres Bild dar. Sie ziehen zur Unterscheidung der DC-Subpopulationen eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen heran: CD1a, CD1b, CD1c, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD16, CD34, CD45RA, CD123 und IL-3-Rezeptor (Wan & Dupasquier, 2005).

Die Einteilung von DC-Subpopulationen stellt nicht nur im Mensch ein Problem dar, auch die Vergleichbarkeit von humanen und murinen DC-Subpopulationen ist eine große Herausforderung für die Wissenschaft. So ist ein grundlegendes Problem, dass bis heute kein humanes Äquivalent zum murinen Oberflächenmarker CD8α gefunden wurde. Humane DCs scheinen CD8α nicht zu exprimieren (Shortman & Liu, 2002). Sowohl funktional, wie phänotypisch und ontogenetisch ist eine klare Zuordnung von murinen DC-Subpopulationen zu humanen Subpopulationen bisher nicht gelungen (Guilliams *et al.*, 2010; Henri *et al.*, 2010; Wan & Dupasquier, 2005). Die neueste Arbeit vergleicht DC-Subpopulationen zwischen unterschiedlichen Spezies anhand molekularer, phänotypischer und funktioneller Eigenschaften (Dutertre, Wang, & Ginhoux, 2014).

Unbestritten ist hingegen die zentrale Rolle der DCs im Immunsystem. So stellen sie den Schnittpunkt zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Immature DCs können effizient Antigene aufnehmen und prozessieren. Am Ende dieser Prozessierung steht die Präsentation auf MHC-Molekülen. Jedoch kann die Präsentation durch immature DCs keinen Stimulus an T-Zellen übertragen. Naive T-Zellen werden dadurch nicht aktiviert und eine

Immunantwort eher noch verhindert. Erst wenn die DCs durch ein bestimmtes Zytokin-Milieu im Rahmen einer Entzündung dazu angeregt wird, zu maturieren, vermag die mature DC T-Zellen zu stimulieren und eine Immunantwort zu induzieren. Auf die Maturierung hin ändert die DC die Expression von Oberflächen-Molekülen. So bleiben die MHC I- und MHC II-Moleküle stabil an der Zelloberfläche, die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) werden vermehrt exprimiert (Keir & Sharpe, 2005). Auch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wird verändert, was zur Folge hat, dass die maturen DCs in die Lymphknoten wandern und mit der Sekretion von Chemokinen beginnen. In den Lymphknoten treten die DCs in regen Kontakt zu T-Zellen. Erkennt eine T-Zelle das auf dem MHC-Molekül präsentierte Antigen, wird eine spezifische Immunantwort induziert (Matzinger, 2007). Je nach vorherrschendem Zytokin-Milieu, das die mature DC maßgeblich prägt, kann sich die T-Zelle zu einer T_H1 -, T_H2 - oder T_H17 -Zelle entwickeln. Unter bestimmten Umständen können auch zytotoxische T-Zellantworten initiiert werden (Langenkamp, Messi, Lanzavecchia, & Sallusto, 2000).

Die Funktion der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 ist weitestgehend bekannt. Auf T-Zellen befinden sich die entsprechenden Rezeptoren CD28 und CTLA-4. Dabei haben diese beiden Rezeptoren entgegengesetzte Funktionen: während CD28 ein aktivierendes Signal an die T-Zelle sendet und diese aktiviert, führt die Bindung von CTLA-4 an ein kostimulatorisches Molekül zur Hemmung der Immunantwort und zur Induktion von Toleranz gegen das präsentierte Antigen (Keir & Sharpe, 2005). Entscheidend für die resultierende Immunantwort und die T-Zellproliferation ist das Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Signalen durch CD28 und CTLA-4. Beispielsweise kann die Proliferation, die Differenzierung, das Überleben der T-Zelle und die von der T-Zelle verursachte B-Zellantwort durch die Signale der DC bestimmt werden. Turner *et al.* zeigten, dass microRNAs bei der Differenzierung und Funktion von DCs eine regulierende Rolle spielen (Turner, Schnorfeil, & Brocker, 2011). Immature DCs sind somit zuständig für die permanente Aufnahme und Prozessierung von Antigenen. Nach erfolgreicher Maturierung der DCs, sind diese für die Ausgestaltung der nachfolgenden Immunantwort zuständig. So aktivieren sie T-Zellen durch die Expression von Oberflächenmolekülen und die Sekretion von Chemokinen. DCs können hierdurch zu peripherer Toleranz, zu regulatorischen T-Zellen und zur Initiation einer Immunantwort führen und die Reaktion des Immunsystems auf bestimmte Antigene maßgeblich steuern. Dies macht DCs so interessant und unterstreicht ihre zentrale Stellung im Immunsystem.

So wird auch die Rolle von DCs in der EAE und der MS immer besser verstanden. Die Schwere der klinischen Zeichen in der EAE scheint, wie auch die Anzahl an Entzündungsherden in MS-Patienten, mit dem Vorkommen und dem Status der DCs im Gehirn zu korrelieren. Werden CD11c⁺ DCs vollkommen depletiert, so verschlimmert sich der Verlauf einer EAE. Umgekehrt sind DCs in der Lage, regulatorische T-Zellen zu generieren und so tolerogen zu wirken (Yogev et al., 2012). Demgegenüber zeigten PATERKA et al. einen signifikant abgeschwächten Verlauf der EAE bei Depletion der CD11c⁺ DCs. Durch *in vivo*-Mikroskopie zeigten sie die herausragende Rolle CD11c⁺ DCs bei der Infiltration des ZNS durch pathogene T-Zellen (Paterka et al., 2016). Ebenso zeigte die Injektion von *in vitro*-generierten DCs, die mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein - Peptid beladen wurden, eine dramatische Verschlechterung des Krankheitsverlaufs und die Akkumulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im ZNS (Grunberger et al.). Ebenso wurden DCs mit einer erhöhten Expression von Aktivierungsmarkern im Blut und CSF von MS-Patienten in stark erhöhter Konzentration nachgewiesen, im Vergleich zu gesunden Probanden. Dies legt einen entscheidenden Einfluss von DCs auf die Pathogenese von MS nahe.

In diesem Zusammenhang konnten bereits einige Biomarker auf DCs erforscht werden, die mit MS korrelieren. So sind bei myeloiden DCs (CD11⁺, CD1c⁺) die Marker CD40, CD80, CD86 und HLA-DR im CSF von MS-Patienten signifikant zum peripheren Blut erhöht (Alvermann, Hennig, Stuve, Wiendl, & Stangel, 2014).

1.2.3 B-Zellen

B-Zellen entstehen, genau wie T-Zellen, im Knochenmark (Roitt, Greaves, Torrigiani, Brostoff, & Playfair, 1969) aus hämatopoetischen Stammzellen über lymphoide Vorläuferzellen, die sich schließlich nach mehreren Zwischenstadien zu naiven B-Zellen entwickeln (LeBien, 2000). Entdeckt wurden sie allerdings in Vögeln. Dort werden sie in der *Bursa fabricii* produziert, einem lymphatischen Organ oberhalb der Kloake (Warner & Szenberg, 1963). Daher leitet sich auch die Abkürzung „B“-Zellen ab. Erkennt eine B-Zelle über ihren B-Zellrezeptor ihr spezifisches Antigen, so nimmt sie es auf, prozessiert es und präsentiert ein Peptid auf MHC II-Molekülen auf ihrer Oberfläche (Vascotto et al., 2007). Durch die Interaktion mit CD4⁺ T-Zellen, die ihr spezifisches Antigen auf MHC II Molekülen der B-Zelle erkennen und die Bindung von CD40 an CD40L oder die Ausschüttung von Zytokinen seitens der T-Zelle, kann die B-Zelle aktiviert werden. Das Antigen wird hierbei als ein thymusabhängiges Antigen bezeichnet (Grewal & Flavell, 1998). Zum anderen können aber auch viele B-Zell-Rezeptoren durch sich wiederholende Epitope quervernetzt werden. In diesem Fall benötigt die B-Zelle kein weiteres Signal einer CD4⁺ T-Zelle. Die Quervernetzung alleine reicht aus, um die B-Zelle zum Immunglobulin- (Ig) -Klassenwechsel und der Ausschüttung von Antikörpern zu bewegen. Hierbei wird von einem thymusunabhängigen Antigen gesprochen.

Durch die Sekretion von Antikörpern stellen B-Zellen eine entscheidende Schaltstelle im Immunsystem dar: die humorale Immunantwort. Sezernierte Antikörper können Teile des angeborenen Immunsystems aktivieren und damit die Pathogenese der MS maßgeblich beschleunigen (Antel & Bar-Or, 2006; Dunkelberger & Song, 2010). Dies wird auch in der Diagnostik zu Hilfe gezogen. Werden erhöhte IgG-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis (CSF) nachgewiesen, zeigt dies die intrathekale Infiltration von antikörper-produzierenden B-Zellen an (Tibbling, Link, & Ohman, 1977). Im intakten Zustand der Bluthirnschranke können B-Zellen das Gehirnparenchym nicht infiltrieren. In Verbindung mit Antikörpern und Molekülen des Komplementsystems können B-Zellen die Bluthirnschranke passieren und im ZNS eine Entzündung hervorrufen. Dass B-Zellen in der Pathogenese von MS eine entscheidende Rolle spielen, konnten Versuche zeigen, bei denen man B-Zellen in MS-Patienten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen CD20 depletierte. Im Magnetresonanztomographen (MRT) konnte daraufhin gezeigt werden, dass B-Zell-depletierte MS-Patienten eine geringere Anzahl von Läsionen im ZNS aufwiesen (Bar-Or et al.,

2008; Hauser et al., 2008). Dies beweist die Beteiligung von B-Zellen bei der Bildung von akuten Läsionen.

1.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis – das Tiermodell der MS

Einen Großteil der heute vorliegenden Erkenntnisse über MS verdanken wir einem Tiermodell dieser autoimmunen Erkrankung: der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis; kurz: EAE. Bereits Louis Pasteur konnte durch Versuche an Tollwut zeigen, dass die Impfung mit xenogenem Nervengewebe zu Lähmungserscheinungen führen kann (Pasteur & Illo, 1996). Versuche mit Gehirnexttrakten an Affen zeigten, dass die Lähmungserscheinungen mit perivaskulären Infiltraten und Demyelinisierung der Nervenzellen im Gehirn und im Rückenmark einhergingen (Rivers, Sprunt, & Berry, 1933). Diese Krankheitssymptome nannten Rivers *et al.* damals noch akute disseminierte Enzephalomyelitis. Etwas später sollte dieser Typus in EAE umbenannt werden.

Im Laufe der Zeit erkannte man, dass der Grad der Lähmungserscheinungen mit dem Titer von Antikörpern gegen neuronales Gewebe korrelierte. Dies führte zu der Idee, die humorale Immunantwort durch die Gabe von Freund's Adjuvans (CFA) und Pertussistoxin (PTX) zu verstärken. Es entwickelte sich dadurch ein schubhaft verlaufendes Krankheitsbild, das besonders durch die perivaskulären Infiltrate in akuten Läsionen an das pathologische Bild von MS erinnerte (Wolf, Kabat, & Bezer, 1947).

Von Affen und Meerschweinchen, in denen solche Versuche zuerst durchgeführt worden waren, erweiterte sich die Forschung auf dem Gebiet der EAE auf weitere Spezies, wie Ratten und Mäuse. Besonders Mäuse haben – experimenteltechnisch gesehen – einen entscheidenden Vorteil: sie kombinieren ein dem Menschen relativ ähnliches Immunsystem mit einer kurzen Generationszeit und geringem Platzbedarf. Mäuse sind leicht in Gefangenschaft zu halten und es existiert eine breite Zahl von Inzuchtstämmen. Diese Vorteile beförderten die Maus zum bevorzugten Modellorganismus für EAE-Experimente.

Die EAE ist das derzeit beste Tiermodell für die Nachahmung von MS. Es zeichnet sich durch viele Gemeinsamkeiten mit der menschlichen Autoimmunkrankheit aus: der Zerstörung der Myelinscheide der Nervenzellen, dem Vorhandensein von – zeitlich und örtlich verteilten – Läsionen im ZNS, der vorwiegend perivaskulär erscheinenden Läsionen, der teilweise

vorkommenden Remyelinisierung und der Nachweisbarkeit von Antikörpern im CSF (Gold, Linington, & Lassmann, 2006).

Die MS-Forschung konnte schnell Fortschritte verzeichnen. So konnten beispielsweise die Antigene, die zur Entwicklung von EAE führten, weiter eingegrenzt werden. Wurden anfangs noch Gehirn-Extrakte verabreicht, so war man bald in der Lage, differenzierte Antigene zu entlarven, die in der EAE eine entscheidende Rolle spielten: Myelin-Basisches-Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (Grunberger et al.) und Proteolipid-Protein (PLP). Weitere Untersuchungen mit diesen Molekülen zeigten, dass enzephalitogene Peptide entscheidend waren. Kleine Bereiche der Makromoleküle, die für die Induktion von EAE ausreichend waren, sind: MBP₈₃₋₉₉, MOG₃₅₋₅₅ und PLP₁₃₉₋₁₅₁. Die Verwendung dieser Peptide erhöhte die Reproduzierbarkeit der Experimente und vertiefte das Verständnis auf dem Gebiet der EAE (Wekerle, Kojima, Lannes-Vieira, Lassmann, & Linington, 1994).

Die oben dargestellten Erkenntnisse führten zu dem auch heute noch am häufigsten verwendeten Modell der EAE: der aktiven EAE. Dabei wird ein enzephalitogenes Peptid in Freundschem Adjuvans injiziert. Zusammen mit der intraperitonealen (i.p.) Injektion von PTX entwickelte sich eine Immunreaktion gegen das eingesetzte Peptid, das zur Ausbildung einer EAE führt. Hierbei gilt es zu beachten, dass unterschiedliche Peptide in demselben Mausstamm zu einem anderen Krankheitsverlauf führen können. Ebenso kann dasselbe Peptid in verschiedenen Mausstämmen unterschiedliche Krankheitsverläufe nach sich ziehen. Injiziert man beispielsweise PLP₁₃₉₋₁₅₁ in SJL-Mäuse, so verläuft die EAE schubhaft. Bei der Injektion von MOG₃₅₋₅₅ in C57BL/6-Mäuse ist der resultierende Krankheitsverlauf chronisch-progressiv (Gold et al., 2006).

Im Gegensatz zur aktiven EAE werden bei der passiven EAE keine Peptide injiziert, sondern *in vitro* kultivierte T-Zellen. Dabei werden naive T-Zellen zusammen mit antigen-beladenen DCs in der Petrischale kultiviert. Zur Kultivierung kommen ebenfalls enzephalitogene Peptide zum Einsatz. Diese T-Zellen werden Mäusen appliziert, die daraufhin eine EAE entwickeln können.

Durch die Verwendung künstlich hergestellter Zytokine, kann bei der Kultivierung der naiven T-Zellen mit den antigen-beladenen DCs ein spezielles Zytokin-Milieu geschaffen werden. Dieses Zytokin-Milieu beeinflusst den Phänotyp der T-Zellen (Herz et al., 2010). Außerdem bieten neue Inzuchtstämme von Mäusen nun die Möglichkeit, Mausstämme mit antigenspezifischen Zellen zu züchten. Bei dieser Art der Transfer-EAE ist es möglich, mit

bestimmten T-Zellsubpopulationen (T_H1 , T_H2 , T_H17) zu experimentieren und deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf isoliert zu betrachten. Ein weiterer Vorteil, den sowohl passive als auch Transfer-EAE bieten, ist die Möglichkeit, durch die Anpassung der injizierten Zellzahl, den Krankheitsverlauf in seiner Schwere beeinflussen zu können.

1.4 Cladribin – ein Zytostaticum

Cladribin ist ein Adenosinderivat und trägt die chemische Bezeichnung 2-Chlor-2-Desoxyadenosin. Damit ist es ein Purin-Analogon, das in die DNA eingebaut werden kann. Ursprünglich wurde es für die Behandlung von Lymphomen verwendet (Beutler, 1992). Heute wird es immer noch für die Langerhans-Histiozytose eingesetzt (McClain, 2005; Weitzman, Wayne, Arceci, Lipton, & Whitlock, 1999). Aber auch bei Autoimmunkrankheiten, wie dem systemischen Lupus erythematoses (Davis et al., 1998) und rheumatoider Arthritis (Schirmer, Mur, Pfeiffer, Thaler, & Konwalinka, 1997) wurde Cladribin als Therapeutikum getestet. Seine Verwendung bei der Behandlung von schubhaft verlaufender MS zeigte erfreuliche Resultate (Giovannoni et al., 2010; Giovannoni et al., 2011; Koziol, Lucero, Sipe, Romine, & Beutler, 1999). In ihren Forschungen im Rahmen der CLARITY-Studie konnten Giovannoni *et al.* zeigen, dass die Einnahme von Cladribin-Tabletten die jährliche Anzahl von Schüben im Vergleich zur Placebo-Gruppe um mehr als die Hälfte verringern konnte. Dies drückte sich auch im MRT in einer signifikant verringerten Anzahl von Läsionen im Gehirn der Patienten aus. Außerdem konnte die Zeit zwischen den Schüben im Vergleich zur Placebo-Gruppe deutlich verlängert werden. Cladribin war eines der ersten oralen Therapeutika. Der Wunsch der Patienten nach oral einnehmbaren Medikamenten war Ende der 1990er Jahre sehr groß und das Interesse der Pharmaindustrie an der Entwicklung von Tabletten sehr hoch. Daher wurde die Forschung auf diesem Gebiet stark vorangetrieben. Merck-Serono® gelang mit Cladribin ein großer Schritt in diese Richtung.

In seiner Wirkung scheint Cladribin die T-Zellen relativ spezifisch und dosis-abhängig zu beeinflussen. Im Rahmen der Einnahme von Cladribin kommt es zu einer lang anhaltenden Lymphopenie, einer deutlichen Reduktion der Lymphozyten. Der Mechanismus ist relativ einfach und konnte bereits früh aufgeklärt werden. Ein spezielles Enzym, die Desoxyzytidinkinase phosphoryliert Cladribin zu seiner aktiven Form des 2-Chlor-2-Desoxyadenosin-Triphosphats. Dieses Nukleotid akkumuliert in der Zelle, wird in die DNA eingebaut und führt dabei zu DNA-Brüchen und der Zerstörung der genomischen DNA.

Dadurch bricht der Metabolismus der Zelle zusammen, und die Zelle geht in den Zelltod über (Seto, Carrera, Kubota, Wasson, & Carson, 1985; Sipe, 2005). Der Grund, warum dies selektiv in Lymphozyten geschieht, liegt darin, dass diese ein besonderes Verhältnis der Enzyme Desoxyzytidinkinase und 5'-Deoxynucleotidase besitzen. Die 5'-Deoxynucleotidase kann das aktivierte 2-Chlor-2-Desoxyadenosin-Triphosphat wieder dephosphorylieren und dadurch zu seiner inaktiven Form umwandeln. In den übrigen Zellen des Körpers halten sich beide Enzyme in ihrer Aktivität die Waage, wodurch sich ein Gleichgewicht zwischen der aktiven und der inaktiven Form von Cladribin einstellt, sodass die aktive Form nicht in der Zelle akkumulieren kann. Lymphozyten haben jedoch eine deutlich höhere Aktivität auf Seiten der Desoxyzytidinkinase, was dazu führt, dass sich 2-Chlor-2-Desoxyadenosin-Triphosphat in der Zelle ansammeln kann und zum Zelltod führt. Andere Arbeitsgruppen konnten auch die Induktion des mitochondrialen Apoptosewegs in Cladribin-behandelten Lymphozyten nachweisen, was die Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 einschließt (Klopfer et al., 2004; Van den Neste, Cardoen, Offner, & Bontemps, 2005). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Cladribin auch in Monozyten und – in geringerem Ausmaß – auch in B-Zellen (Barbieri et al., 1998; Castejon et al., 1997) und DCs (Singh, Prajeeth, et al., 2013) den Zelltod induziert.

Weitere Studien zeigten, dass Patienten, die mit Cladribin behandelt wurden, stark erniedrigte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-2 (Janiec, Wajgt, & Kondera-Anasz, 2001), IL-8 und CCL-5 (Bartosik-Psujek, Belniak, Mitosek-Szewczyk, Dobosz, & Stelmasiak, 2004; Laugel et al., 2011; Singh, Prajeeth, et al., 2013; Singh, Voss, Benardais, & Stangel, 2012) aufwiesen. Neben der Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen konnte auch eine Veränderung der Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 nachgewiesen werden (Niezgoda, Losy, & Mehta, 2001). Dies legt nahe, dass Cladribin auch immunmodulatorische Effekte ausübt. Im Serum und im CSF von MS-Patienten fanden Bartosik-Psujek *et al.* ebenfalls verringerte Konzentrationen proinflammatorischer Chemokine (Bartosik-Psujek et al., 2004). Die Sekretion von Zytokinen durch T-Zellen konnte als vermindert nachgewiesen werden (Laugel et al., 2011), wobei dieser Effekt sowohl direkt durch Cladribin, als auch indirekt durch eine verminderte Aktivierung der T-Zellen hervorgerufen worden sein kann. Es zeigt sich, dass sich die Forschung über Cladribin hauptsächlich auf dessen Einfluss auf Lymphozyten konzentriert hat. Der Einfluss auf APCs wurde bisher kaum untersucht, obwohl APCs eine zentrale Rolle in der Steuerung der Immunantwort des Körpers einnehmen und so auch von

zentraler Bedeutung sind. Die MS-Forschung konzentriert sich nun aber zunehmend auf die APCs und hat sie als wichtiger Angriffspunkt neuer, immunmodulatorischer Medikamente erkannt.

1.5 Laquinimod – oraler Immunmodulator

Zur Behandlung schubförmig verlaufender MS ist Laquinimod ein neues, oral applizierbares, immunmodulatorisches Medikament. Es wurde aus Roquinimex entwickelt, einem Medikament, das anti-inflammatorische Wirkung in der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis zeigte. Während der klinischen Erprobungsphase traten jedoch erhebliche kardiopulmonale Nebenwirkungen auf, aufgrund derer die weitere klinische Erprobung von Roquinimex ausgesetzt wurde (Noseworthy et al., 2000). Wie sein Vorgänger, wirkt Laquinimod inhibitorisch auf den Krankheitsverlauf im Mausmodell der MS. Jedoch ist Laquinimod 20mal effizienter als Roquinimex (Jonsson et al., 2004) und ohne gravierende Nebenwirkungen. Daher wurde Laquinimod in weiteren klinischen und experimentellen Studien eingesetzt. In einer Placebo-kontrollierten Studie der Phase II/IIb milderte Laquinimod den Krankheitsverlauf, wie MRT-Kontrollen belegten, und zeigte keine Nebenwirkungen (Comi et al., 2008; Polman et al., 2005). In einer zweijährigen klinischen Phase III Studie verlangsamte Laquinimod signifikant den Krankheitsverlauf und verringerte die jährliche Schubrate [ALLEGRO Studie (NCT00509145); (Comi et al., 2012)]. Außerdem zeigte die Laquinimod-Behandlung über 24 Monate eine signifikant reduzierte Atrophierate des Gehirns im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Studien im Tiermodell zeigten einen potentiellen neuroprotektiven Effekt von Laquinimod auf (Wegner et al., 2010), was durch Studien bestätigt wurde, in denen Laquinimod im ZNS nach oraler Applikation nachweisbar war (Bruck & Wegner, 2011).

Des Weiteren haben Studien mit Nagetieren einen Effekt von Laquinimod auf die Produktion von Zytokinen gezeigt. So zum Beispiel die Hemmung der Produktion von IFN- γ , TNF- α , IL-12 und IL-17 wie auch die Erhöhung der IL-4 und TGF- β Produktion. Dies legt eine Herabsetzung der Th1 und Th17 Immunantwort nahe (Wegner et al., 2010; Yang, Xu, Xiao, Hedlund, & Link, 2004; Zou et al., 2002).

Diese Modulation von T-Zell-Immunantworten wurde durch Microarray-Analysen von humanen PBMCs nach Laquinimod-Behandlung bestätigt (Gurevich et al., 2010). Im EAE-Modell wurden bei Laquinimod-behandelten Mäusen weniger gehirninfiltrierende Immunzellen gefunden als in unbehandelten (Brunmark et al., 2002). Als Grund für diese reduzierte Infiltrationsrate wurde eine verringerte Adhäsion der Immunzellen zu VCAM-1, einem Integrin, angenommen, wobei die Expression des Antagonisten VLA-4 auf den Immunzellen nicht verringert war (Wegner et al., 2010). Neben einer direkten Wirkung von

Laquinimod auf T-Zellen wäre es denkbar, dass diese Effekte durch akzessorische Zellen wie APCs vermittelt werden. Diese APCs sind ebenfalls wichtige Akteure beim Krankheitsverlauf von EAE und MS, was sie zu interessanten Angriffszielen in der Therapie gemacht hat. Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich vornehmlich mit der Rolle von DCs, den Hauptvertretern professionell Antigen-präsentierender Zellen und dem Einfluss von Laquinimod auf sie. Es konnte gezeigt werden, dass Laquinimod einen regulatorischen Effekt über den NF- κ B Signalweg auf murine und humane DCs ausübt. Dieser Effekt konnte sowohl *in vitro* als auch in mit Laquinimod behandelten MS-Patienten *ex vivo* in Bezug auf die Zytokin- und Chemokinproduktion und auf den Aktivierungsmarker CD86 nachgewiesen werden.

Cladribin und Laquinimod sind selbstverständlich nicht die einzigen Medikamente zur Behandlung von MS. Es stehen noch viele weitere Medikamente zur Verfügung, die immunmodulatorische Wirkungen haben. Bereits 2011 wurden moderne Therapieansätze für die MS erforscht, die unter anderem Glatirameracetat in Kombination mit Epigallocatechingallat (EGCG) einsetzten (Herges, 2011).

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, einen Beitrag zur Erforschung der Wirkung von Cladribin und Laquinimod auf DCs zu leisten und beruht auf zwei Publikationen:

Jolivel, V., Luessi, F., Masri, J., **Kraus, S. H.**, Hubo, M., Poisa-Beiro, L., . . . Waisman, A. (2013). Modulation of dendritic cell properties by laquinimod as a mechanism for modulating multiple sclerosis. *Brain*, 136(Pt 4), 1048-1066.

Kraus, S. H., Luessi, F., Trinschek, B., Lerch, S., Hubo, M., Poisa-Beiro, L., . . . Jolivel, V. (2014). Cladribine exerts an immunomodulatory effect on human and murine dendritic cells. *Int Immunopharmacol*, 18(2), 347-357

Dabei sollen mögliche Wirkungen auf DCs in der MS und deren Mausmodell untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

Material	Hersteller
12 well-Flachbodenplatte	BD Falcon
24 well-Flachbodenplatte	Greiner-BioOne
48 well-Flachbodenplatte	Greiner-BioOne
6 well-Flachbodenplatte	BD Falcon
96 well-Flachbodenplatte	Greiner-BioOne
96 well-Rundbodenplatte	Greiner-BioOne
Ammonium-Heparin-Röhrchen Monovette	Sarstedt
Beacon Designer 8 Software	PREMIER Biosoft International
beta-Szintillograph	Microbeta
FACS Canto II	Becton Dickinson Biosciences
Falcon-Röhrchen 15ml	Greiner BioOne
Falcon-Röhrchen 50ml	Greiner BioOne
HTS-FluoroBlok-Filter	BD Falcon
iCycler iQ	BioRad Laboratories
NanoDrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Scientific
Nylon-Zellsieb (40 / 70µm Porengröße)	Becton Dickinson Biosciences
Petrischalen (10cm)	Becton Dickinson Biosciences
PRISM5	GraphPad Software
Tecan Platereader	TECAN

Zellschaber	Corning
Zellschaber	Corning

2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
^3H-Thymidin	Amersham
AB-Serum (human)	Lonza
Anti-CD14 microbeads	Miltenyi Biotec
anti-CD28 monoklonale Antikörper	R&D Systems
anti-CD3 monoklonale Antikörper	R&D Systems
anti-CD4 microbeads (human)	Miltenyi Biotec
anti-CD4 microbeads (murin)	Miltenyi Biotec
Brefeldin A	Sigma Aldrich
Calcein-AM	Invitrogen
Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen
CD1c (BDCA-1)⁺ Dendritic Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec
CD4 T-cell isolation kit	Miltenyi Biotec
Cladribin	Janssen-Cilag
Cytofix/Cytoperm Kit	Becton Dickinson Biosciences
DNase I (für RNA-Extraktion)	Invitrogen
DNase I (für Zellpräparation)	Roche
FBS superior	Biochrom AG

Fc-Block	Becton Dickinson Biosciences
FCS superior	Biochrom AG
Ficoll Hypaque-Dichtegradienten	PAA-Laboratories
Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC) 70 kDa	Sigma Aldrich
FoxP3 staining set	Natutec
Freund'sches Adjuvans	Difco Laboratories
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Gibco
HEPES	Gibco
Hexamer-Primer	Invitrogen
Ionomycin	Sigma Aldrich
iQ™ SYBR®Green supermix	BioRad Laboratories
Iscoe's modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Gibco
IVIG	Becton Dickinson Biosciences
Kollagenase / Clostridiopeptidase	Sigma Aldrich
Kollagenase D	Roche
Laquinimod®	TEVA Pharmaceuticals
Lipopolysaccharid (LPS)	Alexis Biochemicals
MOG₃₅₋₅₅-Peptid	Research Genetics
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RA	Difco Laboratories
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth
PBS mit zweiwertigen Ionen	Sigma Aldrich
PBS ohne zweiwertige Ionen	Sigma Aldrich

Percoll Dichtegradient	Sigma Aldrich
Pertussistoxin	Sigma Aldrich
Phorbol-12-Miristat-13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich
Phytohämagglutinin	Sigma Aldrich
PLP₁₃₉₋₁₅₁	Pepceuticals
Primer für qPCR	Metabion
Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich
Reinstwasser	B. Braun
Rekombinantes humanes GM-CSF	R&D Systems
rekombinantes humanes IL-2	R&D Systems
Rekombinantes humanes IL-4	R&D Systems
RNeasy® Mini Kit	Quiagen
RPMI-1640	Gibco
SuperScript® III First Strand Synthesis –System	Invitrogen
TACS MTT Cell proliferation assays kit	Trevigen
T-Zell Isolationskit (murin)	Miltenyi Biotec

2.3 Tierstämme

Mäuse der Stämme C57BL/6 und CD90.2⁺ 2D2 wurden von der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz bezogen. Mäuse des Stammes SJL/J wurden bei Janvier gekauft. Alle Methoden wurden unter der Aufsicht autorisierter Personen innerhalb der Richtlinien für die Haltung und Verwendung von Versuchstieren der Europäischen Union durchgeführt.

2.4 Induktion und Untersuchung einer aktiven experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis

Weibliche Mäuse der Stämme C57BL/6 und SJL/J wurden mit 50 µg MOG₃₅₋₅₅-Peptid (Research Genetics) beziehungsweise 250 µg murinem PLP₁₃₉₋₁₅₁ (Pepceuticals), gelöst in Freund'schem Andjuvans (Difco Laboratories) und versetzt mit 10 mg/ml hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories) immunisiert. Die Emulsion wurde als einmalige subcutane Injektion von 100 µl an der Schwanzwurzel beziehungsweise in vier subcutanen Injektionen von 50 µl an der Flanke der SJL/J Mäuse appliziert. Zusätzlich erhielten die immunisierten Tiere 200 ng Pertussistoxin (Sigma Aldrich) intraperitoneal am Tag der Immunisierung und zwei Tage nach Immunisierung.

Der klinische EAE-Verlauf wurde täglich anhand folgender Kriterien dokumentiert: 0: keine Symptome, 1: verminderter Tonus des Schwanzes, 2: Beeinträchtigung des Rollreflexes und teilweise Lähmung der hinteren Extremitäten, 3: komplette Paralyse der hinteren Extremitäten, 4: komplette Paralyse der hinteren Extremitäten und leichte Parese der vorderen Extremitäten, 5: moribund oder tot.

Laquinimod (TEVA Pharmaceuticals) wurde in Reinstwasser (B. Braun) gelöst und bei 4°C gelagert. Die Tiere wurden täglich mit einer Dosis von 25 mg/kg in einem Volumen von 100µl pro Maus oral behandelt. Die Kontrollmäuse erhielten 100 µl Wasser.

2.5 *In vivo* Assay zur T-Zell Proliferation und T-Zell Differenzierung

Aus Milz und Lymphknoten von CD90.1⁺ oder CD90.2⁺ 2D2-Mäusen wurden durch eine Positivselektion mittels MACS®-Beads (Miltenyi Biotec) nach dem Herstellerprotokoll CD4⁺ T-Zellen isoliert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in 10ml PBS (Sigma Aldrich) (pH 7,4) wurden die Zellen für sieben Minuten in 0,5 mM Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) (Invitrogen) in 1ml PBS pro 10⁷ Zellen bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 8 ml RPMI mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) (Biochrom AG) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal in 10 ml RPMI (Gibco) gewaschen, 5-10 x 10⁶ T-Zellen in entsprechendem Volumen PBS aufgenommen und an Tag 6 intravenös (i.v.) C57BL/6 Mäusen appliziert. Die Mäuse wurden vorher mit Laquinimod oder Wasser behandelt. An Tag 7 wurden die Mäuse mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Fünf Tage später wurden

die Lymphozyten aus den periphären lymphatischen Organen isoliert und mittels Durchflusszytometrie (FACS Canto II, BD Biosciences) analysiert. Hierbei wurde die Proliferation (CFSE) oder die T-Zell Differenzierung (Intrazellulärfärbung) untersucht.

2.6 Durchflusszytometrie

Für die Analyse von murinen Zellen wurden Antikörperkonjugate der folgenden Antigene genutzt: CD4, CD8, CD90.1, IL-4, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF- α , CD25, FoxP3, CD45.2, CD11b und CD11c. Für die Färbung humaner Zellen wurden Antikörperkonjugate der folgenden Antigene genutzt: CD11c, CD14, CD40, HLA-DR, CD4, CD83, CD86 und CD45RA. Die Antikörper wurden von Becton Dickinson Biosciences (BD Biosciences) oder eBioscience bezogen. Die intrazelluläre Färbung von FoxP3 wurde mit dem FoxP3 Staining Set (Natutec) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die intrazellulären Färbungen von IFN- γ und IL-17A wurden mit Hilfe des Cytotfix/Cytoperm Kits von BD Biosciences ausgeführt. Die gefärbten Zellen wurden im Durchflusszytometer FACS Canto II gemessen und mit Hilfe der Software FlowJo (Tree Star) ausgewertet.

2.7 Isolation von DCs aus der Milz

Nach Resektion der Milz wurden 2 ml Hank's balanced salt solution (HBSS) (Gibco) mit 100 Units/ml Kollagenase D und DNase I in die Milz injiziert. Für 30 Minuten wurde die Milz bei 37°C im Wasserbad inkubiert bevor sie durch ein Nylon-Zellsieb mit 40 μ m Porengröße (BD Falcon) gepresst wurde. Die damit erhaltenen Einzelzellen wurden sofort für die Durchflusszytometrie gefärbt.

2.8 Isolation von T-Zellen aus dem zentralen Nervensystem

Letal anästhesierte Mäuse wurden transcardial mit eiskaltem PBS perfundiert. Gehirn und Rückenmark wurden vorsichtig herauspräpariert, in kleine Stücke geschnitten und Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Gibco), das 10 mg/ml Kollagenase/Clostridiopeptidase (Sigma) und 200 Units/ml DNase (Baccini et al.) enthielt, aufgenommen. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C unter ständiger Rotation, wurde das Gewebe durch ein Nylon-Zellsieb mit 70 μ m Porengröße (BD Falcon) gedrückt. Die mononukleären Zellen der Zellsuspension wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation (40 / 70 Percoll-Gradient) (Sigma Aldrich) bei 300 x g, 10 Minuten gewonnen. Die mononucleären Zellen wurden in RPMI 1640 (Gibco), das 10 Vol.-% FCS, 50 ng/ml Phorbol-12-Miristat-13-Acetat (Sigma Aldrich), 500 ng/ml

Ionomycin (Sigma Aldrich) und 1 μ /ml Brefeldin A (Sigma Aldrich) enthielt, für 4h bei 37°C stimuliert.

2.9 Kultivierung muriner knochenmarkstämmiger DCs

Femores und *Tibiae* von C57Bl/6 Mäusen wurden aseptisch entnommen. Durch Spülung der Knochen mit RPMI-1640 wurden die Knochenmarkszellen erhalten. Durch die kurzzeitige Aufnahme der Knochenmarkszellen in Lysepuffer, der pro Liter Wasser 8,29 g Ammoniumchlorid, 1 g Kaliumhydrogencarbonat und 37,2 mg Di-Natrium-Ethylen-Diamin-Tetraacetat (pH = 7,3) enthielt, wurden die roten Blutzellen lysiert. Anschließend wurden 4 Millionen Knochenmarkszellen in 10 ml RPMI-1640, das 10% fötales Kuhserum (FBS) (Biochrom), und Granulozyten-Macrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) -haltigen Überstand einer transfizierten 293FT HEK-Zellkultur enthielt, in 10 cm Petrischalen (BD Falcon) ausplattiert. Entsprechend des Versuchsaufbaus wurden der Kultur Medikamente zugesetzt. An den Tagen 3, 6 und 8 der Kultur wurde frisches RPMI-1640 Medium, das frisches GM-CSF enthielt, und die dem Versuchsaufbau entsprechenden Medikamente zugesetzt. Zur Differenzierung in mature DCs wurde immaturen DCs an Tag 9 1 μ g/ml Lipopolysaccharid (Kubasak et al.) (Alexis Biochemicals) für 24h zugesetzt. An Tag 10 wurden die immaturen und maturen *bone marrow-derived* DCs (BMDC) mit Hilfe eines Zellschabers (Corning) geerntet.

2.10 Kultivierung humaner DCs

Venöses Blut von gesunden Spendern wurde in Ammonium (NH₄)-Heparin-Röhrchen (Sarstedt) gesammelt. Alternativ wurde Nabelschnurblut in NH₄-Heparin-Röhrchen gesammelt. Bei experimentell bedingtem, hohem Bedarf an humanen DCs wurde auf Buffy coats der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz zurückgegriffen. All dies und die weitere Behandlung wurden nach den Regeln des Ethikkomitees der Universitätsmedizin Mainz vorgenommen.

Humane mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation unter Zuhilfenahme des Ficoll Hypaque-Dichtegradienten (PAA-Laboratories) gewonnen. Aus diesen PBMCs wurden, mithilfe von humanen anti-CD14 microbeads (Miltenyi Biotec), Monozyten isoliert und deren Reinheit mithilfe der Durchflusszytometrie und einem fluoreszenzmarkierten anti-CD14 Antikörper (BD Pharmingen) bestimmt. Die CD14⁺ Monozytenfraktion wurde in einer Dichte von 3 x 10⁶ Zellen/ml in RPMI-Medium (Gibco) für 7 Tage kultiviert. Dem RPMI-Medium wurden noch

50 ng/ml rekombinantes humanes GM-CSF (R&D Systems), 20 ng/ml rekombinantes humanes IL-4 (R&D Systems), 1% AB-Serum (Lonza) und entsprechende Konzentrationen an Laquinimod oder Cladribin zugesetzt. An Tag 3 wurde frisches Medium mit GM-CSF, IL-4 und AB-Serum mit entsprechender Konzentration eines Medikaments zugegeben. Zur Differenzierung in mature DCs wurde immatures DCs an Tag 6 1 µg/ml Lipopolysaccharid (Kubasak et al.) (Alexis Biochemicals) für 24h zugesetzt, bevor immature und mature *monocyte-derived* DCs (MDDC) an Tag 7 mit Hilfe eines Zellschabers (Corning) geerntet wurden.

2.11 Experimente zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von DCs

Um die Lebensfähigkeit von murinen knochenmark-stämmigen und humanen monozyten-stämmigen DCs zu bestimmen, wurde Calcein-AM (Invitrogen) als Lebendzellfarbstoff eingesetzt. Dieser Farbstoff muss, nachdem er von den Zellen aufgenommen wurde, enzymatisch umgesetzt werden, bevor seine Fluoreszenz sichtbar wird. Propidiumiodid (PI) (Sigma-Aldrich) wurde zur Färbung der toten Zellen eingesetzt. Nach dem Ernten der *in vitro* kultivierten Zellen wurden diese mit Calcein [1 µg/ml] und PI [0,5 µM] gefärbt.

Zusätzlich wurde die Lebensfähigkeit von BMDC mit Hilfe des TACS MTT Cell Proliferation Assays kit (Trevigen) bestimmt. Diese Tests wurden nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. 1×10^6 Zellen wurden in einer 96 well-Flachbodenplatte über Nacht ausgesät. Am folgenden Tag wurden sie für drei Stunden mit dem MTT-Reagens inkubiert, bevor der Lysepuffer zugegeben wurde. Die Messung wurde mit dem Plattenleser infinite 200Pro (Tecan) durchgeführt.

2.12 CFSE-Färbung zur Bestimmung der Proliferation DCs

Zur Bestimmung der Proliferation muriner BMDC wurden frisch isolierte Zellen zwei Mal mit vorgewärmtem RPMI-1640 Medium mit 1% HEPES gewaschen und für 10 Minuten bei 37°C mit 2,5 µM Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Mausmedium gewaschen und sofort in 10 cm Petrischalen in Mausmedium mit GM-CSF-haltigem Überstand einer HEK-Zellkultur und Medikamenten ausplattiert. Zwei Tage später wurden nochmals GM-CSF haltiger Überstand und Medikamente zugegeben. An Tag 3 wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch untersucht.

2.13 T-Zell – Proliferationsassay

Mithilfe des *mixed leucocyte reaction assay* (MLR) wurden humane mature DCs in verschiedenen Zahlenverhältnissen zusammen mit allogenen CD4⁺ T-Zellen kultiviert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit dem T-Zell Isolationskit (Miltenyi Biotec) aus humanen PBMCs gewonnen.

Murine mature DCs wurden mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid beladen und in unterschiedlichen Zahlenverhältnissen mit naiven T-Zellen, die mit anti-CD4 microbeads (Miltenyi Biotec) aus 2D2-Mäusen isoliert und mit anti-CD3 und anti-CD28 monoklonalen Antikörpern (R&D Systems) polyklonal stimuliert wurden, kokultiviert. Die MLR wurde über 3 Tage in 96 well-Rundbodenplatten geführt und am Ende nach einem 16 stündigen Puls von ³H-Thymidin (37 kBq/well, Amersham) in einem β -Szintillographen (Microbeta; Wallac) ausgewertet.

2.14 Aktivierung muriner naiver T-Zellen durch knochenmark-stämmige DCs

Mature BMDC, die unter Cladribin-Behandlung kultiviert wurden, wurden mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid auf MHC II beladen und mit naiven 2D2 T-Zellen kokultiviert. Diese T-Zellen wurden mit dem T-Zell Isolationskit aus Mäusen des Stammes 2D2 entnommen. Nach 6 Tagen Kokultur wurden die Zellen mit oberflächengebundenem anti-CD3 und anti-CD28 für 4 h restimuliert, während in den letzten 2 Stunden Brefeldin A die Sekretion von Zytokinen blockierte. Anschließend wurden in einer Intrazellulärfärbung die Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-10 und IL-4 untersucht.

2.15 Aktivierung humaner naiver T-Zellen durch allogene DCs

Mature DCs wurden in einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml mit allogenen naiven CD4⁺ T-Zellen (1×10^6 Zellen /ml) kokultiviert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden durch einen Positiv-sort mit Hilfe von CD4 microbeads (Miltenyi Biotec) aus menschlichem Nabelschnurblut isoliert. Nach zwei Wochen der Kokultur wurden die Zellen mit Phytohämagglutinin (2,4 μ g/ml) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (1 ng/ml) für 5 Stunden restimuliert, bevor in einer Intrazellulärfärbung die Zytokine IL-2, IFN- γ , TNF- α und IL-4 untersucht wurden.

2.16 Aktivierung polyklonaler MBP₈₅₋₉₉-spezifischer T-Zellen durch autologe DCs

Für die Induktion MBP₈₅₋₉₉-spezifischer T-Zellen *in vitro* wurden 4×10^6 PBMCs eines Spenders mit dem HLA-Typus HLA-DRB1*1501 in einem Volumen von 2 ml/well in einer 24 well-Flachbodenplatte (Greiner BioOne) ausplattiert. Diese wurden mit 25 µg/ml MBP₈₅₋₉₉ stimuliert, wie von Eiz-Vesper *et al.* (Eiz-Vesper, Horn, Daubert, Khattab, & Blasczyk, 2006) bereits beschrieben. An Tag 3 der Kultur wurden 10 U/ml rekombinantes humanes IL-2 (R&D Systems) zugesetzt. An den Tagen 7 und 14 wurden durch einen Positivsort mit αCD4 microbeads (human) die CD4⁺ T-Zellen aus der Kultur isoliert und mit autologen frischen PBMCs, die zuvor mit 25 µg/ml MBP₈₅₋₉₉ beladen und mit 3000 rad bestrahlt worden waren, restimuliert. Nach zwei Restimulationen dieser Art wurden die MBP₈₅₋₉₉ –spezifischen CD4⁺ T-Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml mit maturen DCs (1×10^5 Zellen/ml) cokultiviert. Nach einer Woche Cokultur wurden die Zellen für 4 h mit αCD3 und αCD28 monoklonalen Antikörpern stimuliert, bevor in einer Intrazellulärfärbung IFN-γ, TNF-α und IL-17 untersucht wurden.

2.17 Nachweis von Zytokinen und Chemokinen in Kulturüberständen

Überstände von Zellkulturen maturer DCs oder aus periphärem Blut isolierter CD1c⁺ DCs wurden mit Hilfe des FlowCytomix (eBioscience) untersucht. In humanen Kulturüberständen wurden die Zytokine IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, und IL-22 untersucht. Ebenso wurden die humanen Chemokine GM-CSF, IL-8, MCP-1, MIG-MIP-1α und MIP-1β untersucht.

In murinen Kulturüberständen wurden die Zytokine IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10 und die Chemokine MIP-1α, MIP-1β, MCP-1 untersucht. Zur Auswertung wurde die Software FlowCytomix Pro 2.4 (eBioscience) oder neuer verwendet.

2.18 Migrationsversuche von humanen Monozyten

Zur Untersuchung von Kulturüberständen maturer DCs mit oder ohne medikamentöser Behandlung auf das Migrationsverhalten von Monozyten wurden 50.000 Calcein-gefärbte Monozyten in 100µl Migrationsmedium aufgenommen und in die obere Kammer des HTS-FluoroBlok-Filters (BD Falcon) pipettiert. Die Monozyten wurden vorher mit CD14 microbeads (Miltenyi Biotec) aus PBMCs isoliert. In der unteren Kammer befanden sich bereits 700µl humaner Kulturüberstände von maturen DCs, die während ihrer Kultivierung mit Medikamenten behandelt wurden oder unbehandelt geblieben waren.

Die Migration wurde nach 2h beendet, indem der FluoroBlok-Filter in 2% PFA fixiert und die Zellen in der unteren Kammer wie auf der Unterseite des Filters gezählt wurden.

2.19 Phagozytoseverhalten immaturer DCs

1×10^5 humane, bzw. murine DCs wurden nach ihrer Kultivierung in 100µl PBS mit 1 mg/ml Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC; 70 kDa; Sigma Aldrich) für 30 Min bei 37°C, bzw. 0°C bei der Negativkontrolle, inkubiert. Durch das Zufügen von 2ml eiskaltem PBS wurde die Inkubation gestoppt. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit kaltem PBS gewaschen und im FACSCanto II Durchflusszytometer analysiert.

2.20 Analyse von DCs aus peripherem humanem Blut

Blut von gesunden Spendern ($n = 15$), unbehandelten MS-Patienten ($n = 13$) und Laquinimod-behandelten MS-Patienten ($n = 14$) wurde, unter Beachtung der Vorgaben des Ethikkomitees der Universitätsmedizin Mainz, in NH_4 -Heparinröhrchen gesammelt. Alle Spender gaben dazu ihre schriftliche Einwilligung. Aus dem Blut wurden PBMCs isoliert und aus diesen mit Hilfe des CD1c (BDCA-1)⁺ Dendritic Cell Isolation Kits (Miltenyi Biotec) konventionelle DCs (CD1c⁺) gewonnen. Die Reinheit und die Expression der Oberflächenmarker CD86, HLA-DR und CD1c der CD1c⁺ konventionellen DCs wurden mittels der Durchflusszytometrie bestimmt. Aus der Fraktion der CD1c⁻ Zellen wurden anschließend CD14⁺ Monozyten mit einem Positivsort durch Anti-CD14 microbeads (Miltenyi Biotec) isoliert. Die CD1c⁺ DCs wurden in 96-Wellrundbodenplatten (200.000 Zellen/ml) ausplattiert. Jeweils die Hälfte der Zellen wurde mit LPS maturiert. Die CD14⁺ Monozyten wurden in 48-Wellplatten in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml (für 4 h Inkubation), bzw. in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml (für 24h Inkubation) ausplattiert.

Nach 4 h Inkubation wurden konventionelle CD1c⁺ DCs und CD14⁺ Monozyten geerntet und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung in der RNA-Extraktion (siehe Kap. 2.22) weggefroren. Nach 24 h wurden die Zellkulturüberstände konventioneller CD1c⁺ DCs und CD14⁺ Monozyten abgenommen und ebenfalls bei -80°C bis zur weiteren Verwendung in der Messung der Zytokine und Chemokine (siehe Kap. 2.17) asserviert.

2.21 Durchflusszytometrische Analyse von Untergruppen humaner DCs

Humane PBMCs wurden mit α CD3/ α CD14/ α CD19-FITC, α HLA-DR-PE-Cy5, α CD11c-APC-Cy7, α CD1c-Pacific Blue, α CD141-APC, α CD16-PE-Cy7 und α CD303-PE (Becton Dickinson Biosciences) gefärbt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die Untergruppen (Subsets) der DCs, die als CD3⁻/CD14⁻/CD19⁻/HLA-DR⁺ charakterisiert wurden, analysiert. Konventionelle DCs wurden dabei als CD11c⁺ und CD1c⁺, CD16⁺ oder CD141⁺ definiert. Plasmazytoide DCs wurden als CD11c⁻ und CD303⁺ definiert. Alle diese durchflusszytometrischen Färbungen und Messungen wurden von Dr. Mario Hubo in der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

2.22 RNA-Extraktion und quantitative Polymerasekettenreaktion

Von den bei -80°C weggefrorenen CD1c⁺ und CD14⁺ Zellen, sowie den bei -80°C asservierten humanen und murinen DCs wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits (Qiagen) die gesamte RNA extrahiert. Um die Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern, wurde eine Behandlung mit DNase I (Invitrogen) (Baccini et al.) durchgeführt. Mit Hilfe des NanoDrop 2000c Spektrophotometers (Thermo Scientific) wurde die Reinheit und Menge an isolierter RNA bestimmt. Diese gesamte RNA wurde unter Zuhilfenahme des SuperScript® III First Strand Synthesis –Systems (Invitrogen) und Hexamer-Primern (Invitrogen) nach dem Herstellerprotokoll in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Für die Analyse der cDNA in der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurden mit Hilfe der Beacon Designer 8 Software (PREMIER Biosoft International) die murinen (siehe Tabelle 1) und humanen Primer (siehe Tabelle 2) designt. Alle Primer wurden von der Firma Metabion bezogen. Die Effizienz und Spezifität der Primer wurde getestet, die optimale Annealing-Temperatur mit Hilfe einer Gradienten-qPCR ermittelt. Für die qPCR wurden iQ™ SYBR®Green supermix (BioRad Laboratories) und der iCycler iQ (BioRad Laboratories) verwendet. Die relativen Unterschiede in der Expression der verschiedenen Gene wurden

mittels der $\Delta\Delta C_t$ Methode (Livak & Schmittgen, 2001) mit den Haushaltsgenen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH), β -Actin, Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA) oder Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) ermittelt.

Tabelle 1: Sequenzen der Oligonukleotide für die Amplifikation muriner Proben

Sequenzen der Oligonukleotide (Primer) für die Amplifikation muriner Proben				
Gen	Bestell #	<i>forward</i> -Primer (5'-3')	<i>reverse</i> -Primer (5'-3')	Amplikon-Größe [bp]
Elongationsfaktor 1 α (EF-1 α)	X1366.1	TACAGTCAGAAGAGATACG	GAACCAAGGCATATTAGC	150
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH)	GU214026.1	CAGCAACTCCCACTCTTC	TGTAGCCGTATTCAATGTCAT	101
Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA)	NM_008907.1	CAAGACCAGCAAGAAGAT	GCAGAGATTACAGGACATT	146
κ B-Kinase- β -Inhibitor (IKK- β)	NM_010546.2	CGGCTCTTAGATACCTTCA	GCTCCTTGGCATATCCTA	126
κ B-Kinase- γ -Inhibitor (IKK- γ)	AY112937.1	ACCTCTGACTTCTGTTG	TCTGCTGCTCCTACTCTA	98
Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1)	NM_010493.2	ACTGGACTATAATCATTC	CCTTCTGTAACCTGTATA	114
Interleukin-1 Rezeptor Typ I (IL-1R1)	NM_008362.2	GCCATATACAATGCTCTC	TCTGCTTAATGAACTGAATA	109
Interleukin-1 Rezeptor Typ II (IL-1R2)	NM_010555.4	AGACAATACCAGCATCATT	TAAGCAGCCGAGATAAAC	124

Tabelle 2: Sequenzen der Oligonukleotider für die Amplifikation humaner Proben

Sequenzen der Oligonukleotide (Primer) für die Amplifikation humaner Proben				
Gen	Bestell #	<i>forward</i> -Primer (5'-3')	<i>reverse</i> -Primer (5'-3')	Amplikon-Größe [bp]
β -Actin	NM_001101.3	TTAGTTGCGTTACACCTTTC	ACCTTCACCGTTCCAGTT	150
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH)	AF261085.1	TATGACAACAGCCTCAAG	TTCCACGATACCAAAGTT	99
Chemokine (C-C motif)Ligand 3 (CCL3, MIP-1 α)	NM_002983.2	TCCACAGAATTTTCATAGC	CTTGTTAGGAAGATGACC	76
Chemokine (C-C motif)Ligand 4 (CCL4, MIP-1 β)	NM_207007.2	GCATCTCCTCCATACTCA	CCTAATACAATAATACAGCACAT	89
Interleukin 1 β (IL-1 β)	M15330.1	CTTCAGCCAATCTTCATT	CACTGTAATAAGCCATCAT	88
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	NM_000594.2	CCTGACATCTGGAATCTG	CTGGAAACATCTGGAGAG	128

2.23 Statistische Analyse

Alle Daten wurden mit Hilfe von PRISM5 (Graphpad Software) analysiert. Alle Daten werden als $mean \pm SEM$ von zwei unabhängigen Experimenten (EAE, *in vivo* Assays) und mindestens drei unabhängigen Experimenten (*in vitro* Experimente) dargestellt. Die statistische Analyse der Daten wurde mit Hilfe eines non-parametrischen Tests (Mann-Whitney oder Kruskal-Wallis Test) gefolgt von einem Vergleichstest (Dunn's multiple comparison) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von Cladribin auf DCs

3.1.1 Cladribin zeigt keinen akut toxischen Effekt auf DCs *in vitro* in nanomolaren Konzentrationen

Um einen möglicherweise toxischen Effekt von Cladribin auf DCs zu untersuchen, wurden gleiche Anzahlen von murinen BMDC für 10 Tage *in vitro* kultiviert und über die gesamte Zeit mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cladribin behandelt. Diese reichten von 0 bis 10 μM . Cladribin in den Konzentrationen von 10 und 100 nM erniedrigte die Zellzahlen nach der 10 tägigen Kultur geringfügig, aber signifikant. Die Konzentration von 1 μM und höher ließ nur wenige Zellen am Ende der Kultur lebendig (vgl. Abb. 1A). Ein ähnliches Experiment mit humanen MDDC zeigte, dass die Zellzahlen nach 10 tägiger Kultur ab einer Konzentration von 2,5 nM signifikant reduziert waren (vgl. Abb. 1B). Um herauszufinden, ob die reduzierten Zellzahlen am Ende der Kultur auf einen toxischen Effekt oder auf eine verminderte Proliferation zurückzuführen waren, wurden die murinen und humanen DCs nach der Kultur mit Propidiumiodid (PI) und Calcein gefärbt. Hierbei wurde für alle Cladribin-Konzentrationen kein Unterschied bei den murinen BMDC in Bezug auf den Zelltodfarbstoff PI nach den 10 Tagen Kultur festgestellt (29,8% PI-positive Zellen in unbehandelter Kontrolle; 32,2% PI-positive Zellen unter Behandlung mit 100 nM Cladribin) (vgl. Abb. 1C). Ebenso konnte kein Unterschied bei der Färbung mit dem Lebendfarbstoff Calcein festgestellt werden: sowohl die Verhältnisse von Calcein-positiven Zellen als auch die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten für Calcein waren bei allen Cladribin-Konzentrationen (2,5 nM – 100 nM) gleich. Auch bei den humanen MDDC wurde die Viabilität der Zellen nach 6 Tagen Kultur unter Cladribin-Behandlung bis zu 7,5 nM nicht beeinträchtigt (17,8% PI-positive Zellen in unbehandelter Kontrolle; 23,8% PI-positive DC unter 7,5 nM Cladribin) (vgl. Abb. 1D).

Eine mögliche Ursache der verringerten Zellausbeute bei Kultivierung mit Cladribin könnte eine reduzierte Proliferation der Zellen sein. Dazu führte Dr. Valerie Jolivel einen Proliferations-Assay mit einer CFSE-Färbung von BMDC durch. Die Behandlung der Zellen mit 100 nM Cladribin führte zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation. Eine Inkubation mit 1 μM Cladribin stoppte die Proliferation nahezu gänzlich (vgl. Abb. 1E). Dieses Bild wurde durch die parallel durchgeführte Färbung der Zellen mit PI bestätigt. Die mit 1 μM Cladribin

behandelten Zellen überlebten kaum (vgl. Abb. 1E). Die Färbung der Zellen mit MTT durch Dr. Nicola Hoppmann nach einem Tag Kultur mit Cladribin in einer Konzentration von 100 nM zeigte einen akut toxischen Effekt auf BMDC (vgl. Abb. 1F).

□ Control
■ Cladribine

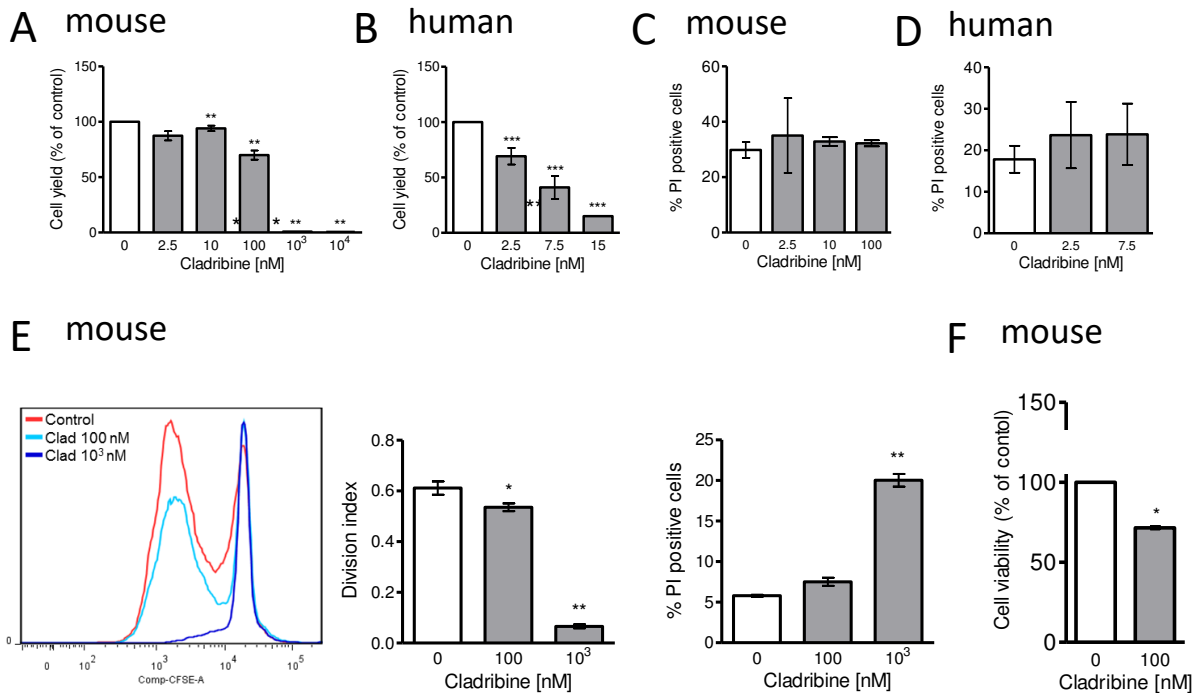


Abb. 1: Wirkung von Cladribin auf Zellzahl und Zellfunktionen. (A) Cladribin beeinflusst die Zellausbeute (Cell yield) von knochenmark-stämmigen BMDC und (B) monozyten-stämmigen MDDC. Die Zellzahl wurde am Ende der Kultivierungszeit nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Cladribin bestimmt. (C) Um den Zelltod durch die Kultivierung mit verschiedenen Konzentrationen an Cladribin zu bestimmen, wurde mit Hilfe von Propidiumiodid (PI) die Zahl der toten Zellen (PI positive cells) am Ende der Kultivierungszeit von knochenmark-stämmigen BMDC und (D) monozyten-stämmigen MDDC bestimmt. (E) Nach einer Kultivierung von drei Tagen wurde die Proliferation von BMDC mit Hilfe von CFSE untersucht. Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment aus einer Reihe von vier unabhängigen Experimenten. Cladribin reduzierte den Teilungsindex (division index) dosisabhängig signifikant. Die Färbung mit Propidiumiodid zeigte eine dosisabhängige Zunahme an toten Zellen (PI positive cells). (F) Unter Zuhilfenahme von MTT konnte die Überlebensfähigkeit (Cell viability) der BMDC getestet werden. Die Konzentration von 100 nM führte zu einer signifikanten Abnahme der Überlebensfähigkeit. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwerts ($n \geq 3$) dar, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Abb. 1 aus: (Kraus et al., 2014)

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass Cladribin in Konzentrationen von mehr als 10 nM (für BMDC), bzw. 2,5 nM (für MDDC) die finale Zellzahl der kultivierten DCs signifikant reduziert, jedoch *in vitro* keinen akut toxischen Effekt ausübt. Aufgrund dieser Daten wurden alle weiteren Experimente mit Cladribin-Konzentrationen von bis zu 100 nM (für BMDC) und bis zu 7,5 nM (für MDDC) durchgeführt.

3.1.2 Cladribin verringert die Phagozytose von immaturren DCs

Die Endozytose von löslichen Antigenen durch immature DC wurde mit Hilfe von Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) gemessen. In BMDC wurde die FITC-Dextranaufnahme unter Einfluss von Cladribin in einer Konzentration von 100 nM nicht signifikant verändert (vgl. Abb. 2A). Im Gegensatz dazu wurde die Endozytose von FITC-Dextran bei MDDC unter Behandlung mit 7,5 nM Cladribin signifikant erniedrigt (vgl. Abb. 2B).

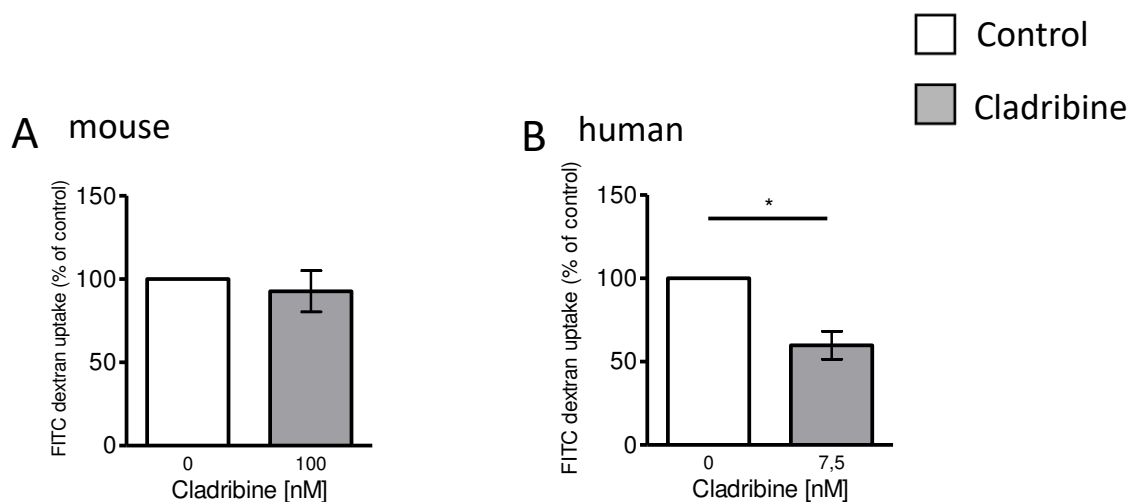


Abb. 2: Einfluss von Cladribin auf die Phagozytose. (A) Phagozytose von löslichem FITC-markiertem Dextran durch immature BMDC und (B) immature MDDC nach Kultivierung unter Behandlung mit Cladribin. Die Aufnahme von FITC-Dextran wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwerts ($n \geq 3$) dar, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Abb. 2 aus: (Kraus et al., 2014)

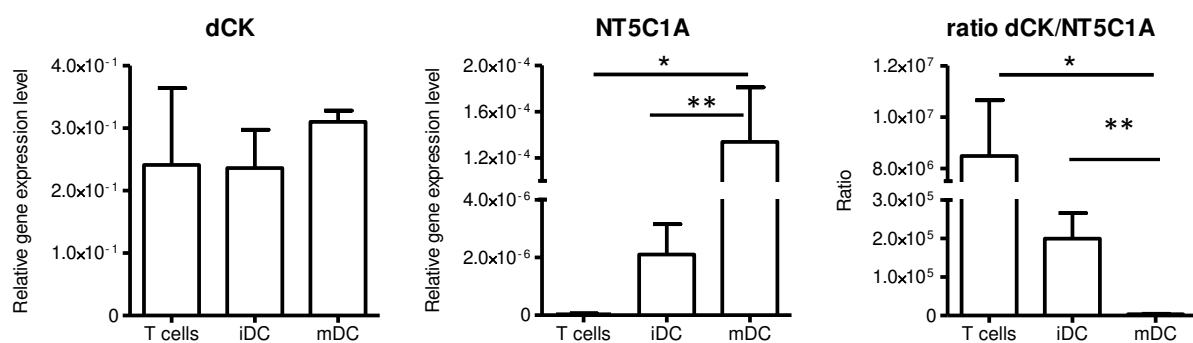
3.1.3 Das Zusammenspiel zweier Enzyme steuert die Toxizität von Cladribin

Da der toxische Effekt von Cladribin von dem Verhältnis der enzymatischen Aktivität zweier Enzyme abhängt, der Deoxycytidinkinase (dCK) und der 5'-Deoxynucleotidase (NT5C1A), wollten wir untersuchen, ob DCs möglicherweise besonders anfällig für die Behandlung mit Cladribin sind. Mit Hilfe der qPCR konnte gezeigt werden, dass die relative Expression der Deoxycytidinkinase in immaturren und maturen BMDC und T-Zellen gleich war. Die qPCR wurde freundlicherweise von Andreas Zymny durchgeführt. Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, die 5'-Deoxynucleotidase in T-Zellen nachzuweisen. In BMDCs war die 5'-Deoxynucleotidase nachweisbar, wobei die Expression in maturen bedeutend höher war als in immaturren BMDC (vgl. Abb. 3A).

Die relative Expression von Deoxycytidinkinase und 5'-Deoxynucleotidase war in humanen T-Zellen höher als in immaturren und maturen MDDC. Setzt man die Expression beider Enzyme ins Verhältnis, so lassen die Daten die Voraussage zu, dass humane DCs deutlich stärker die toxische Form von Cladribin akkumulieren als die murinen BMDC (vgl. Abb. 3B).

Daraus kann geschlossen werden, dass murine DCs weniger stark die phosphorylierte, aktive Form von Cladribin akkumulieren als es Lymphozyten möglich ist. Dies erklärt den erst in höheren Cladribin-Konzentrationen auftretenden akut toxischen Effekt.

A mouse



B human

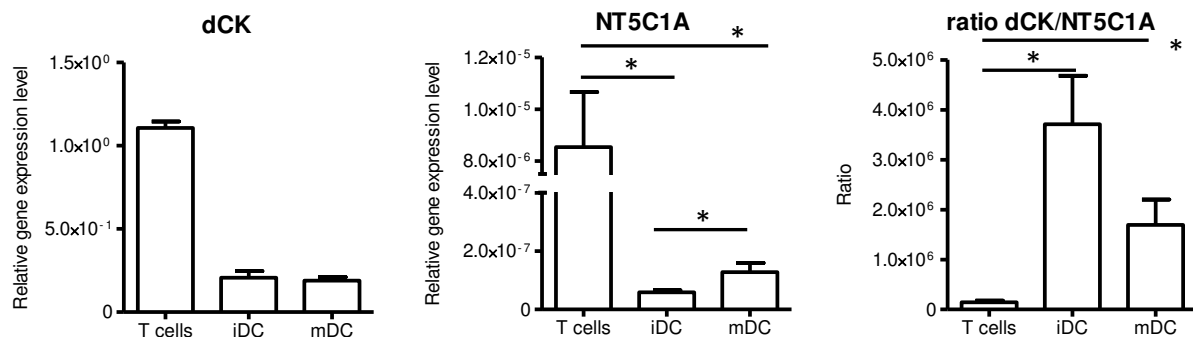


Abb. 3: Genexpression von Deoxycytidinkinase und 5'-Deoxynucleotidase in murinen und humanen DC. (A) Relative Genexpression (relative gene expression level) von Deoxycytidinkinase (dCK) und 5'-Deoxynucleotidase (NT5C1A) in BMDC und **(B)** humanen MDDC. Die Genexpression wurde normalisiert auf die Expression von GAP-DH als Haushaltsgen in murinen T_H17 -zellen (BMDC) und humanen $CD4^+$ T-Zellen (MDDC). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwerts ($n > 3$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Abb. 3 verändert nach: Kraus et al., 2014

3.1.4 Cladribin greift nicht in den Differenzierungsprozess DCs ein

Um auszuschließen, dass Cladribin einen Einfluss auf den Differenzierungsprozess der DCs hat, wurden durchflusszytometrische Färbungen des Oberflächenmoleküls CD11c durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von murinen BMDCs mit 100 nM Cladribin (vgl. Abb. 4A), ebenso wie die Behandlung humaner, immaturer und maturer MDDCs mit 7,5 nM Cladribin keine Änderung der CD11c-Expression auf der Zelloberfläche nach sich zog (vgl. Abb. 4B und 4C). Daraus kann geschlossen werden, dass Cladribin nicht auf den Differenzierungsprozess einwirkt.

3.1.5 Cladribin verändert die Oberflächenmoleküle von DCs *in vitro*

Die Funktion der DCs ist zum Teil von den Expressionsmustern von Oberflächenmolekülen abhängig. Um einen möglichen immunmodulatorischen Effekt von Cladribin nachzuweisen, wurde die Expression von Oberflächenmolekülen, die für die immunologische Funktion von immaturen und maturen DCs essentiell sind, untersucht. Bei immaturen BMDCs konnte keine signifikante Änderung der Expression von CD80, CD83, CD86 und MHC II nachgewiesen werden. Bei maturen BMDCs war ein signifikanter Anstieg der Oberflächenmoleküle CD86 und MHC II bei einer Behandlung mit 100 nM Cladribin nachweisbar (vgl. Abb. 4A).

Immature MDDCs zeigten einen signifikanten Anstieg der Expression des Maturierungsmarkers CD83 und der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 nach einer Behandlung mit 7,5 nM Cladribin (vgl. Abb. 4B). Bei den mit LPS maturierten MDDCs waren unter Behandlung mit 7,5 nM Cladribin das kostimulatorische Oberflächenmolekül CD86 und MHC II signifikant erhöht, wobei die anderen untersuchten Oberflächenmarker keine signifikanten Expressionsunterschiede zeigten (vgl. Abb. 4C).

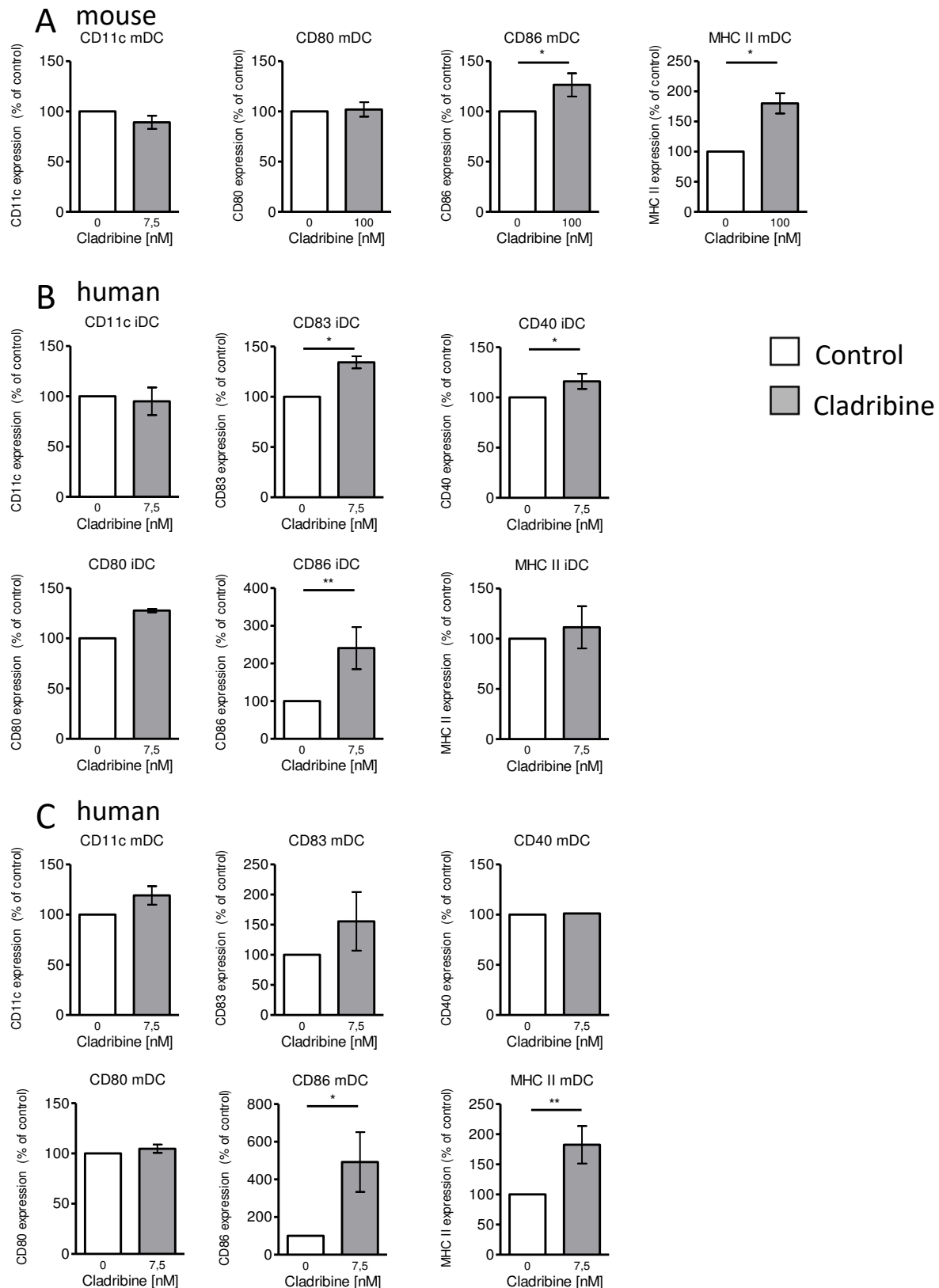


Abb. 4: Das Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen wird durch Cladribin verändert. (A) Expression der Oberflächenmoleküle CD11c, CD80, CD86 und MHC II auf matten BMDC nach Kultivierung unter Cladribin-Behandlung (100 nM). Die Expression unter Cladribin-Behandlung wurde auf die Expression unter Normalbedingungen normiert. (B) Expression der Oberflächenmoleküle CD11c, CD83, CD40, CD80, CD86 und MHC II auf immaturren MDDC und (C) matten MDDC nach Kultivierung unter Cladribin-Behandlung (7,5 nM), normiert auf die Expression unter Normalbedingungen. Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwerts (n = 3), *p < 0,05, **p < 0,01.

3.1.6 Cladribin verändert die T-Zell polarisierende Funktion von DCs

In Kokultorexperimenten von murinen BMDC und murinen 2D2 T-Zellen wurde die T-Zell polarisierende Funktion von Cladribin-behandelten DCs untersucht. Hierzu wurden BMDCs generiert und mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid beladen. Diese DCs wurden für 6 Tage mit naiven antigen-spezifischen 2D2 T-Zellen kokultiviert. Intrazelluläre immunzytochemische Färbungen der 2D2 T-Zellen nach der Kokultur zeigten, dass eine große Mehrheit der mit unbehandelten BMDCs kokultivierten 2D2 T-Zellen TNF- α produzierten. Weniger als 4% produzierten IFN- γ und nur ein geringer Anteil der T-Zellen produzierte IL-10 und IL-4 (vgl. Abb. 5A). Wurden naive 2D2 T-Zellen mit BMDCs kokultiviert, die zuvor mit 7,5 nM Cladribin behandelt worden waren, so entwickelten sich signifikant weniger TNF- α - und IFN- γ -produzierende Zellen, wohingegen der Anteil IL-10-produzierender Zellen stark anstieg. Der Anteil IL-4 produzierender T-Zellen änderte sich nicht unter Vorbehandlung der DCs mit Cladribin (vgl. Abb. 5A). Dies lässt den Schluss zu, dass Cladribin die T-Zell polarisierende Funktion von DCs dahingehend verändert, dass naive T-Zellen bei Vorbehandlung der DCs mit Cladribin weniger zum T_H1 Phänotyp polarisiert werden, und mehr zu einem T_{reg} Phänotyp.

Zur Untersuchung, ob Cladribin auch die Proliferation der T-Zellen beeinträchtigt, wurde in Proliferationsassays die T-Zellantwort von allophen humanen CD4⁺ T-Zellen auf mature Cladribin-behandelte und unbehandelte MDDCs untersucht. Dabei konnte keine Änderung der T-Zell stimulatorischen Fähigkeit der DCs gezeigt werden (vgl. Abb. 5B). Da der Klinik für Neurologie keine Genehmigung zur Arbeit mit ³H-Thymidin vorliegt, wurden die Proliferationsassays freundlicherweise durch Mario Hubo in der Hautklinik durchgeführt.

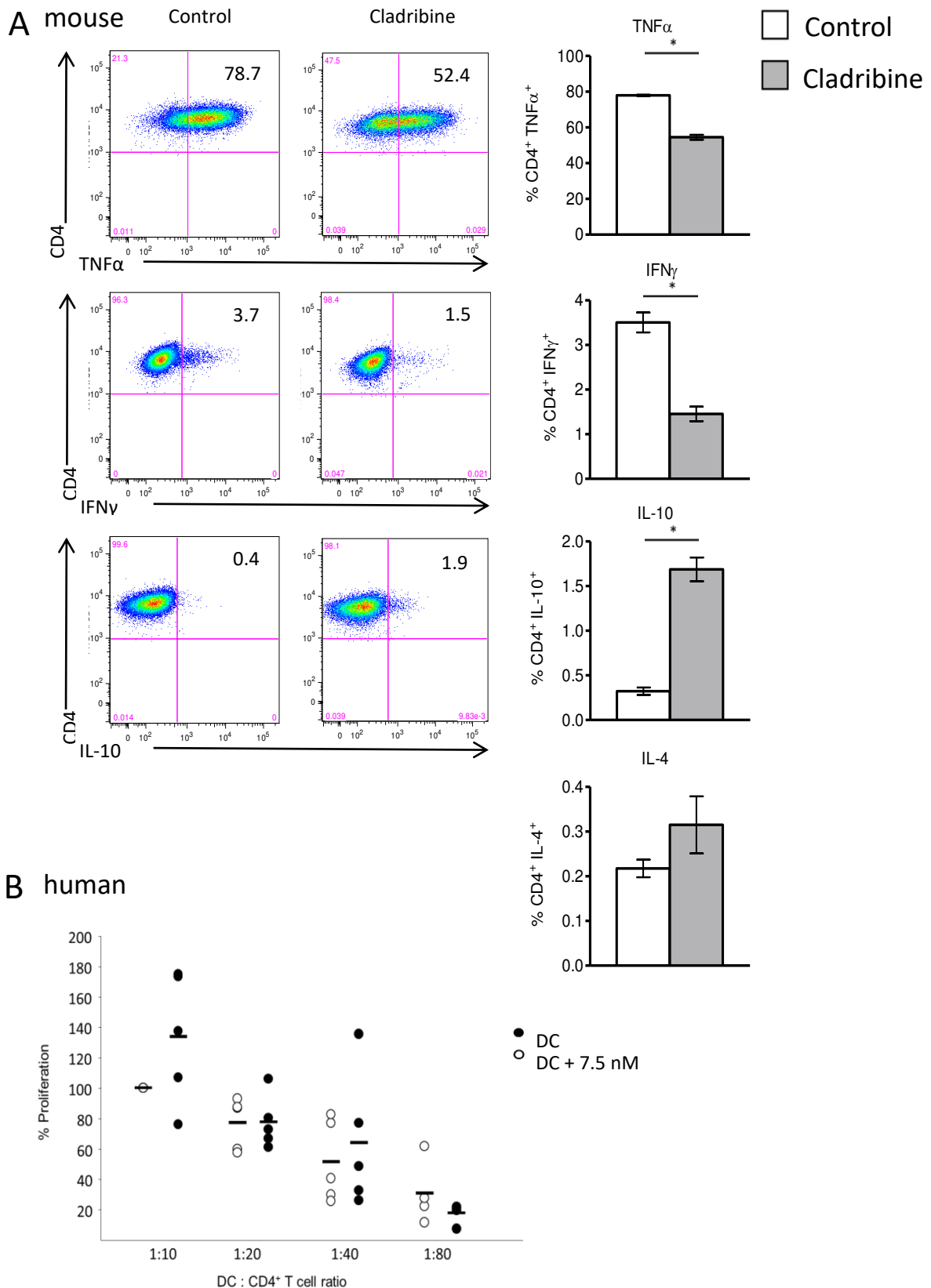


Abb. 5: Cladribin ändert die T-Zell polarisierende Funktion Dendritischer Zellen. (A) Murine knochenmark-stämmige Dendritische Zellen wurden unter Behandlung mit Cladribin [2,5 nM] kultiviert. Danach wurden sie geerntet und mit murinen 2D2 T-Zellen kokultiviert. Die behandelten BMDC verringerten die Produktion von TNF- α und IFN- γ signifikant, während die Produktion von IL-10 durch die T-Zellen signifikant erhöht wurde. Die Produktion von IL-4 durch die 2D2 T-Zellen wurde nicht signifikant verändert. Die gezeigten Werte repräsentieren den Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwerts (n = 4), *p < 0,05. (B) Unter Behandlung mit 7,5 nM Cladribin wurden mature MDDC einer *mixed leucocyte reaction* (MLR) mit allogenen CD4 $^{+}$ T-Zellen in verschiedenen T-Zell : MDDC Verhältnissen unterzogen. Zur Quantifizierung der Reaktion wurde [3H] Thymidin eingesetzt und die Radioaktivität der T-Zellen bestimmt. Das Diagramm zeigt die normalisierte [3H] Thymidin-Inkorporation (n = 5). Die MLR wurde von Mario Hubo durchgeführt

Abb. 5 aus: (Kraus et al., 2014)

3.1.7 Die Zytokin- und Chemokinsekretion von murenen DCs wird durch Cladribin beeinträchtigt

DCs sind die Hauptquelle für verschiedene Zytokine und Chemokine, die für die Initiierung und Regulation einer Immunantwort wichtig sind. Zur Untersuchung, ob die Behandlung von DCs mit Cladribin eine Auswirkung auf das Sekretionsmuster von Zytokinen und Chemokinen hat, wurden *in vitro* generierte murine und humane DCs während der gesamten Kulturzeit mit Cladribin behandelt. Die Konzentrationen der in den Kulturüberständen vorhandenen, von den DCs sezernierten Zytokine und Chemokine wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

Die Behandlung von murinen BMDCs mit 7,5 nM Cladribin erniedrigte die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β in den Kulturüberständen maturierter BMDCs signifikant, während die Produktion von IL-6 unverändert blieb (vgl. Abb. 6A). Ebenso war die Produktion von TNF- α und IL-1 β in humanen Kulturüberständen maturierter MDDCs, die mit 7,5 nM Cladribin behandelt worden waren, signifikant erniedrigt. Auch hier blieb die Sekretion von IL-6 unbeeinflusst (vgl. Abb. 6B).

Bemerkenswerterweise wurde auch die Chemokinsekretion von murinen und humanen, maturierten DCs durch Cladribin beeinflusst. So waren in den Kulturüberständen maturer muriner BMDCs die Konzentrationen von MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-1 unter Behandlung der DCs mit 7,5 nM Cladribin im Vergleich zu unbehandelten DCs signifikant reduziert (vgl. Abb. 6C). Bei den entsprechenden humanen Zellen war die Sekretion von MIP-1 α , MIP-1 β und MIG signifikant reduziert (vgl. Abb. 6D). Die Produktion von MCP-1 durch DCs wurde durch die Behandlung mit 7,5 nM Cladribin nicht verändert.

Eine wichtige Funktion von Chemokinen ist die Anlockung von Immunzellen zum Ort der Entzündung. Diese Funktion wurde mit Hilfe eines Migrationsassays untersucht, wobei die Migration humaner CD14⁺ Monozyten auf Kulturüberständen maturer behandelter und unbehandelter DCs untersucht wurde. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Kulturüberstände Cladribin-behandelter MDDCs eine deutlich weniger attraktive Wirkung auf die Monozyten ausübten, als die Kulturüberstände unbehandelter MDDCs (vgl. Abb. 6E).

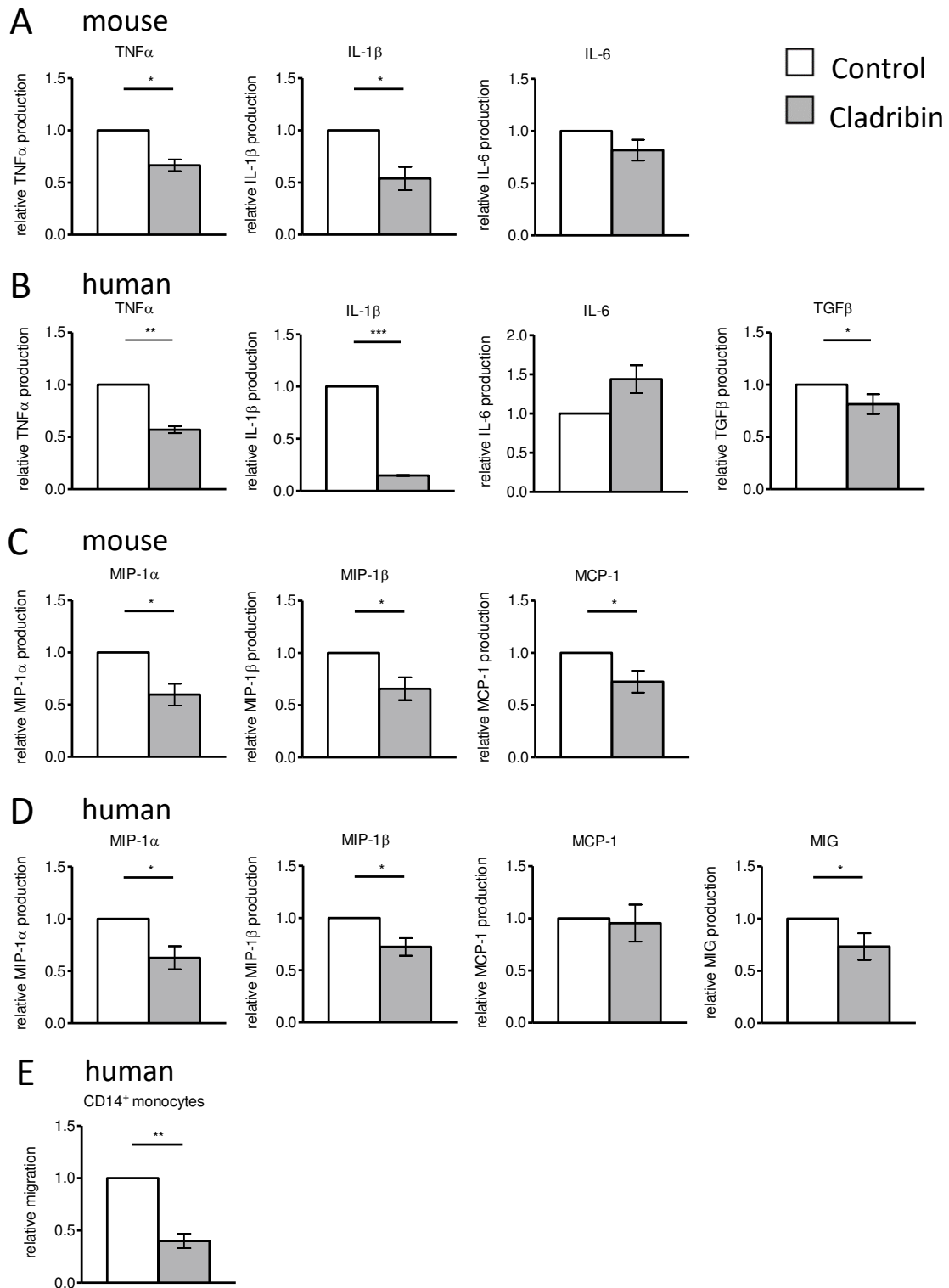


Abb. 6: Cladribin verändert die Cytokin- und Chemokin-Produktion von humanen und murinen Dendritischen Zellen. (A, B) Cytokine und (C, D) Chemokine, die im Überstand von muren BMDC-Kulturen (A, C) und muren MDDC-Kulturen (B, D) nachgewiesen wurden. Alle Kulturen wurden mit 7,5 nM Cladribin behandelt. Die Cytokin- und Chemokin-Produktion der mit Cladribin behandelten DC ist normiert auf die Produktion unter Normalbedingungen. Alle Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwerts angegeben ($n \geq 3$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (E) Migration von humanen CD14 $^{+}$ Monozyten auf Kulturüberständen von humanen muren MDDC. Die Migration der Monozyten auf Kulturüberständen murer, Cladribin-behandelter MDDC wurde auf die Migration auf Überständen unter Normalbedingungen normiert.

Abb. 6 aus: (Kraus et al., 2014)

3.2 Wirkung von Laquinimod auf DCs

3.2.1 Laquinimod wirkt inhibierend auf die T-Zellproliferation

Vorversuche, die in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Medizin zusammen mit Dr. Youmana Masri durchgeführt wurden, hatten gezeigt, dass Laquinimod einen starken positiven Einfluss auf den Verlauf der EAE in SJL-Mäusen hat. So konnte bei prophylaktischer Behandlung der Mäuse mit Laquinimod in keiner Maus eine EAE evoziert werden. Bei therapeutischer Behandlung in der Remissionsphase wurde ein weiterer Schub in allen Versuchstieren erfolgreich verhindert (Jolivel et al., 2013). Der Einfluss von Laquinimod auf den Verlauf der EAE in SJL-Mäusen warf die Frage auf, ob Laquinimod einen Effekt auf die T-Zellproliferation hat. Weitere Experimente zeigten eine leichte Reduktion der T-Zellproliferation durch die Behandlung mit Laquinimod im Vergleich zu Mäusen, die mit Wasser behandelt worden waren. Dieser Effekt könnte auf dem direkten Einfluss von Laquinimod auf T-Zellen oder auf dem indirekten Effekt von Laquinimod über APCs beruhen.

Zur Beurteilung, ob Laquinimod einen proliferationshemmenden Effekt auf humane T-Zellen hat, wurden CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern polyklonal mit α CD3 und α CD28 monoklonalen Antikörpern stimuliert. Anschließend wurde die Proliferation mit der ³H-Thymidin-Methode untersucht. Die Proliferationsassays wurden von Dr. Mario Hubo in der Hautklinik durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Proliferation der T-Zellen nicht durch Laquinimod beeinträchtigt wurde (Jolivel, 2013). Auch nach der polyklonalen Stimulation muriner CD4⁺ T-Zellen *in vitro* konnte kein Einfluss von Laquinimod auf die Proliferation festgestellt werden. Erst eine Behandlung von T-Zellen mit Laquinimod-Dosen von mehr als 100 μ M zeigte einen Trend hin zu reduzierter Proliferation (Jolivel, 2013).

Daraus kann auf einen indirekten Effekt von Laquinimod auf die Proliferation von T-Zellen durch den Einfluss auf APCs geschlossen werden. So war die Proliferation von alloogenen humanen CD4⁺ T-Zellen signifikant reduziert, wenn sie mit alloogenen murenen MDDCs kokultiviert wurden, die während ihrer Kultivierung mit Laquinimod behandelt worden waren (vgl. Abb. 7). Die Daten weisen so auf eine leichte Reduktion der T-Zell-stimulatorischen Kapazität Laquinimod-behandelter DCs hin.

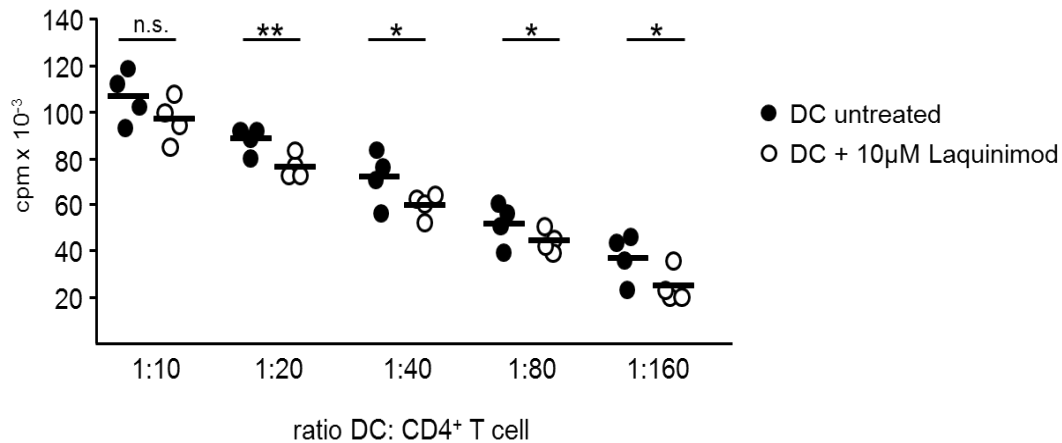


Abb. 7: Laquinimod verringert die Fähigkeit von monozyten-stämmigen DC, T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Humane monozyten-stämmige DC wurden mit 10 µM Laquinimod behandelt oder unter Normalbedingungen (untreated) kultiviert. Anschließend wurden sie mit allogeenen CD4⁺ T-Zellen in unterschiedlichen Zahlenverhältnissen ausplattiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde mit Hilfe des [3H] Thymidin-Inkorporations-Assays bestimmt. Dargestellt sind die Absolutwerte. *p < 0,05, **p < 0,01. cpm = counts per minute, n.s. = nicht signifikant. Der [3H]-Thymidin-Inkorporations-Assay wurde von Dr. Mario Hubo durchgeführt.

Abb. 7 aus: (Jolivel et al., 2013)

3.2.2 Laquinimod hat Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung

Die Ergebnisse zum Einfluss von Laquinimod auf die Proliferation von T-Zellen ließen die Frage aufkommen, ob Laquinimod auch einen Einfluss auf die Differenzierung dieser Zellen hat. In Vorversuchen konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass Laquinimod *in vivo* die Menge an IL-17A-produzierenden T-Zellen (T_H17-Zellen) signifikant reduzierte. Zusätzlich war die Anzahl der IFN-γ-produzierenden, mutmaßlichen T_H1-Zellen in den Lymphknoten der Laquinimod-behandelten Mäuse signifikant reduziert (vgl. (Jolivel et al., 2013)).

Um den Einfluss von Laquinimod auf die Polarisierung humaner T-Zellen zu untersuchen, wurden naive T-Zellen aus humanem Nabelschnurblut durch allogene mature MDDC, die unter Behandlung mit Laquinimod oder unbehandelt kultiviert wurden, geprimed (Jonuleit, Schmitt, Schuler, Knop, & Enk, 2000). Die intrazelluläre Färbung von Zytokinen nach der Kokultivierung mit unbehandelten MDDC zeigte eine Mehrheit von TNF-α und IFN-γ produzierenden T-Zellen, während IL-4 produzierende T-Zellen die Minderheit bildeten. Dies wurde bereits in der Vergangenheit gezeigt (Chen et al., 2012; Klein et al., 1997). Erwähnenswert ist auch, dass IL-17 nicht nachweisbar war. Bereits 2007 konnten Acosta-Rodriguez *et al.* zeigen, dass mature MDDC keine T_H17-Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen initiieren konnten (Acosta-Rodriguez, Napolitani, Lanzavecchia, & Sallusto, 2007). Die

Kokultur naiver CD4⁺ T-Zellen mit Laquinimod-behandelten MDDC zeigte signifikant reduzierte Zahlen IFN- γ -produzierender Zellen. Bezüglich TNF- α -, IL-2- und IL-4- produzierender T-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Um die Ergebnisse des Antigen-spezifischen Effekts der Laquinimod-Behandlung vom murinen System auf das humane System zu übertragen, wurden MBP₈₅₋₉₉-spezifische T-Zellen *in vitro* durch MBP₈₅₋₉₉-gepulste autologe mature MDDC, die während ihrer Kultivierung mit Laquinimod behandelt oder nicht behandelt wurden, stimuliert. Diese Restimulation von T-Zellen durch Laquinimod-behandelte MDDCs resultierte in signifikant erniedrigten Zahlen IFN- γ - und TNF- α -produzierender Zellen.

Diese Vorversuche machten deutlich, dass Laquinimod die T-Zell-stimulierenden Eigenschaften von DCs beeinträchtigt.

3.2.3 Laquinimod zeigt keinen toxischen Effekt bei therapeutischen Dosierungen *in vitro*

Da Laquinimod die T-Zellproliferation durch die Modulation von DCs leicht zu beeinflussen scheint, sollte dieser Effekt auch in humanen und murinen DCs *in vitro* untersucht werden. Zuerst sollte in einem Experiment ausgeschlossen werden, dass Laquinimod einen toxischen Effekt auf DCs hat. Hierzu wurden BMDC mit verschiedenen Konzentrationen von Laquinimod behandelt, die von 1 μ M bis zu 250 μ M reichten. Nur die höchste Konzentration zeigte hier eine Verringerung der Zellzahl (vgl. Abb. 8A). Bei humanen MDDC war ebenfalls kein toxischer Effekt bei Laquinimod-Konzentrationen bis hin zu 10 μ M nachweisbar. Erst bei einer Konzentration von 100 μ M wurde die Zellzahl am Ende der Kultur signifikant reduziert (vgl. Abb. 8B). Hieraus wird ersichtlich, dass Laquinimod keinerlei toxischen Effekt auf DCs ausübt, wenn es in therapeutischen Dosierungen zwischen 0,1 μ M und 1 μ M eingesetzt wird (Gurevich et al., 2010).

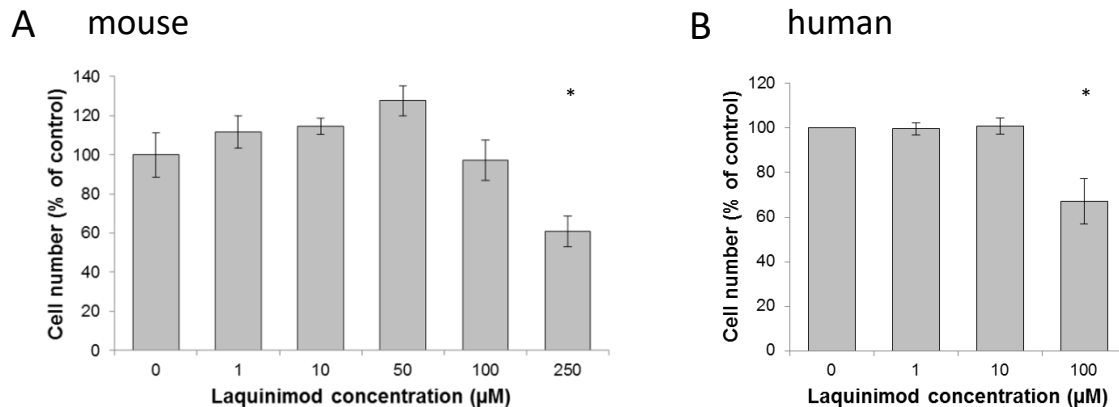


Abb. 8: Einfluss von Laquinimod auf die Zellzahl nach *in vitro*- Kultur. (A) bei knochenmark-stämmigen Dendritischen Zellen und (B) monozyten-stämmigen Dendritischen Zellen wurde nach der Kultur mit verschiedenen Laquinimod-Konzentrationen die Zellzahl bestimmt. Die Grafiken zeigen die auf die unter Kontrollbedingungen normierten Zellzahlen (Mittelwerte) und die dazugehörige Standardabweichung der Mittelwerte ($n \geq 3$) * $p < 0,05$.

Abb. 8 aus: (Jolivel et al., 2013)

3.2.4 Laquinimod ändert Subpopulationen von murinen DCs *in vivo*

Um den Effekt von Laquinimod auf Populationen DCs *in vivo* zu untersuchen, wurde in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Medizin eine durchflusszytometrische Analyse von DCs aus Milzen Laquinimod-behandelter C57BL/6 Mäuse durchgeführt. Wie bereits beschrieben (Schulze-Topphoff et al., 2012) konnten nur niedrige Zellzahlen von CD4⁺ DCs nach einer 9-tägigen Behandlung mit Laquinimod gefunden werden. Das Verhältnis von CD8⁺ zu CD4⁺CD8⁻ DCs war signifikant erhöht. Interessanterweise reichte bereits eine orale Applikation von Laquinimod aus, um die Populationen der DCs zu modifizieren, da bereits an Tag 1 nach der Gabe von Laquinimod die CD4⁺ DCs reduziert waren, was einen früheren Zeitpunkt als den bei Schulze-Topphoff untersuchten darstellt. Des Weiteren konnte eine Abnahme der *mean fluorescence intensity* (MFI) von CD8 bei den CD8⁺ DCs aus der Milz durch Laquinimod beobachtet werden. Die Analyse der kostimulatorischen Moleküle auf CD11c⁺CD11b⁺ konventionelle DCs der Milz ergab eine Erhöhung von CD86 durch die Behandlung mit Laquinimod (Jolivel, 2013). Daraus ist zu schließen, dass Laquinimod die Subpopulationen der DCs und deren Phänotyp *in vivo* beeinflusst.

3.2.5 **Laquinimod verändert die Zytokin- und Chemokinproduktion in konventionellen DC und beeinflusst die Migration von Monozyten**

DCs sind eine der Hauptquellen verschiedener Zytokine, die für die Initiierung und Regulation von Immunantworten wichtig sind. Zur ersten Analyse des von den DCs sezernierten Zytokinmusters wurde ein Screening mit Hilfe des Multiplex Kits (Miltenyi Biotec) durchgeführt, um relevante Zytokine zu finden und nicht nachweisbare Botenstoffe auszuschließen. In Überständen von Laquinimod-behandelten humanen maturen MDDC-Kulturen waren die Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-10 signifikant erniedrigt, verglichen mit unbehandelten Kulturen. Die Sekretion von IL-6 blieb unverändert (vgl. Abb. 9A).

Im Einklang zu diesen Ergebnissen in den humanen Kulturen, erniedrigte die Laquinimod-Behandlung auch in Kulturen muriner BMDC die Sekretion von TNF- α und IL-1 β signifikant. Ebenso blieb die Produktion von IL-6 unverändert. Allerdings konnte in den murinen Kulturüberständen keine IL-10 Produktion nachgewiesen werden, da die Konzentration von IL-10 in den Kulturüberständen unterhalb des Detektionslimits lag (vgl. Abb. 9B).

Interessanterweise übt Laquinimod auch einen Einfluss auf die Chemokinproduktion humaner maturer MDDC aus. MIP-1 α , MIP-1 β und MIG waren in den Überständen Laquinimod-behandelter MDDC signifikant reduziert, im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Zusätzlich konnte eine leichte Reduktion der MCP-1 Produktion festgestellt werden (vgl. Abb. 9C).

In murinen Überständen von BMDC-Kulturen war die Sekretion von MIP-1 α signifikant erniedrigt, wohingegen die MIP-1 β und MCP-1 Sekretion nach Laquinimod-Behandlung unverändert blieben (vgl. Abb. 9D).

Chemokine sind funktionell relevant für die Chemotaxis von Monozyten. Daher wurde in einem Assay zum Migrationsverhalten von humanen Monozyten das chemotaktische Potenzial der Kulturüberstände von humanen MDDC-Kulturen überprüft. Dabei zeigten Kulturüberstände von Laquinimod-behandelten DC ein signifikant reduziertes Potenzial, humane Monozyten zur Migration anzuregen. Ein direkter migrationshemmender Effekt von Laquinimod wurde dadurch ausgeschlossen, dass in einem Kontrollexperiment Medium alleine mit Laquinimod versetzt wurde (vgl. Abb. 9E).

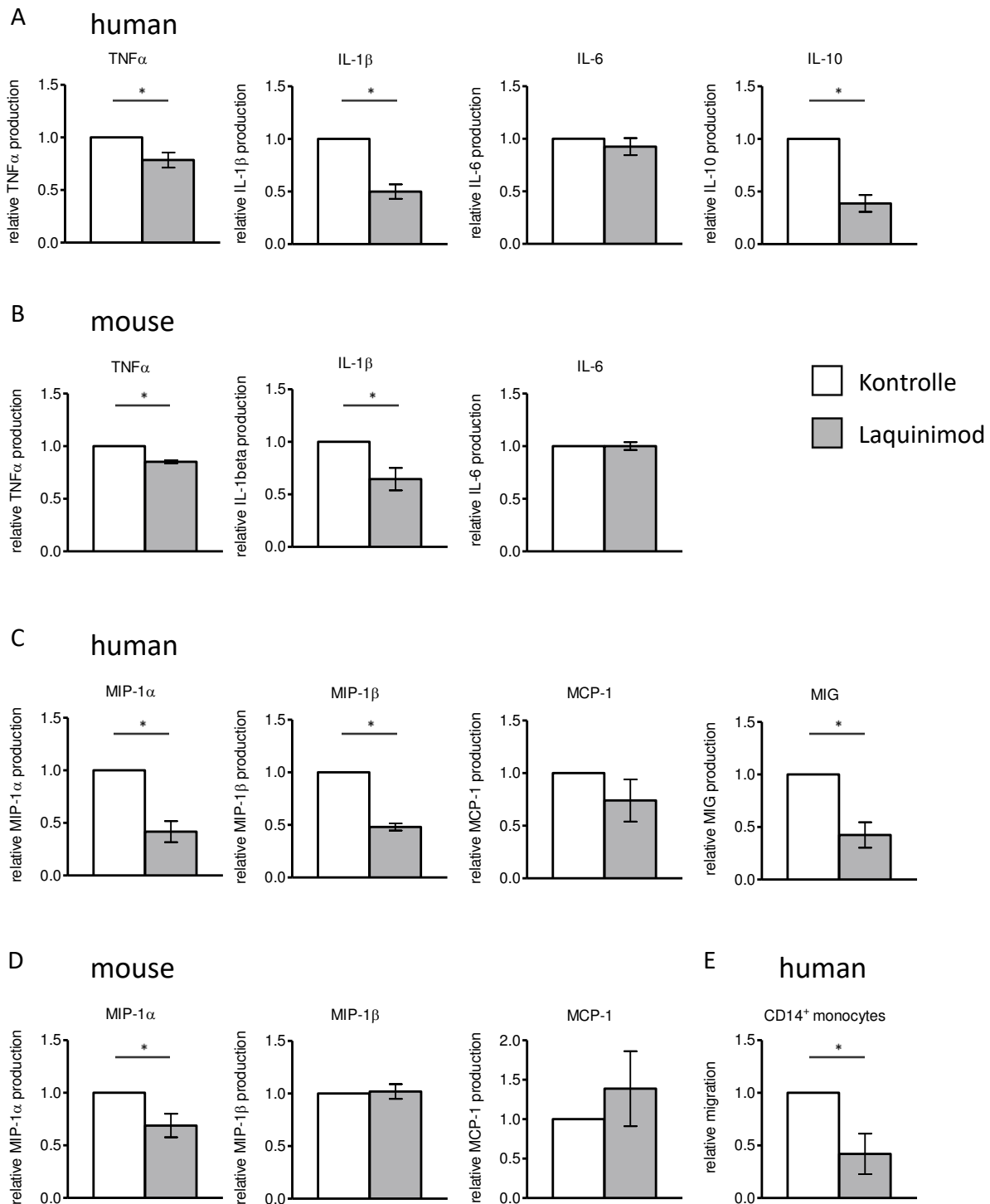


Abb. 9: Produktion von Cytokinen und Chemokinen durch humane und murine Dendritische Zellen. Dendritische Zellen wurden mit und ohne Laquinimod-Behandlung aus Knochenmark von Mäusen (**B** und **D**) oder aus Monozyten aus peripherem Blut von Menschen (**A** und **C**) kultiviert und am vorletzten Tag der Kultur mit LPS maturiert. Die Kulturüberstände wurden entnommen und auf Cytokine (**A** und **B**) und Chemokine (**C** und **D**) hin untersucht. Die Versuchsergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ SEM der relativen Cytokin- und Chemokinproduktion zusammengefasst ($n \geq 3$), * $P < 0,05$. (**E**) relative Migration humaner CD14⁺ Monozyten auf Kulturüberständen humaner maturer Dendritischer Zellen ($n = 4$), * $P < 0,05$.

Abb. 9 verändert aus: (Jolivel et al., 2013)

3.2.6 **Laquinimod verändert die Zytokin- und Chemokinproduktion *in vivo* und erniedrigt den Anteil CD1c⁺ DCs und plasmazytoider DCs im Blut**

Um die Untersuchungsergebnisse auf die Situation in Patienten zu übertragen, wurde Blut von gesunden Spendern, unbehandelten MS-Patienten und von MS-Patienten gewonnen, die eine tägliche Dosis von 0,6 mg Laquinimod oral einnahmen (vgl. Tabelle 3). Das Alter der Patienten sollte für diese Untersuchungen keinen Störfaktor darstellen, da das mittlere Alter der untersuchten Personengruppen gleich war und außerdem der Alterungsprozess keinen Einfluss auf konventionelle DC in dem untersuchten Altersabschnitt hat (Orsini et al., 2012). Die Laquinimod-behandelten und die unbehandelten Patienten zeigten einen vergleichbaren Krankheitsstatus, der durch den *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) definiert wurde. Die Menge an isolierten PBMC aller drei Gruppen war gleich (vgl. Abb. 10A). Innerhalb der isolierten PBMC war die Zahl isolierter CD1c⁺ DC bei Laquinimod-behandelten Patienten signifikant erniedrigt [$1,82 \pm 0,25 \times 10^5$] im Vergleich zu unbehandelten Patienten [$3,45 \pm 0,63 \times 10^5$] und gesunden Spendern [$4,57 \pm 0,47 \times 10^5$]. Die durchflusszytometrische Analyse der humanen PBMC bestätigte, dass innerhalb der konventionellen DC (definiert als CD11c⁺ HLA-DR⁺) der Prozentanteil der CD1c⁺ Zellen unter Laquinimod-Behandlung signifikant erniedrigt war im Vergleich zu unbehandelten Patienten und gesunden Spendern, aber auch zwischen unbehandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern. Im Gegensatz dazu war der Anteil von CD16⁺ und CD141⁺ konventionellen DC-Untergruppen nicht beeinträchtigt (vgl. Abb. 10A). Ferner war der Anteil plasmazytoider DC (definiert als CD11c⁻ HLA-DR⁺ CD303⁺) in Laquinimod-behandelten MS-Patienten signifikant reduziert im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen (vgl. Abb. 10A). Interessanterweise war die MFI der CD1c-Expression bei Laquinimod-behandelten Patienten signifikant reduziert, verglichen mit den beiden anderen Versuchsgruppen (vgl. Abb. 10B). Zudem konnte eine signifikante Steigerung des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf den isolierten CD1c⁺ Zellen von Laquinimod-behandelten Patienten im Vergleich zu unbehandelten Patienten und gesunden Kontrollen festgestellt werden, so wie es auch schon bei den konventionellen DCs aus Milzen Laquinimod-behandelter Mäuse nachweisbar war (Jolivel, 2013). Die Expression von HLA-DR war nicht signifikant verändert (vgl. Abb. 10B).

Tabelle 3: Daten zu den in die Studie eingeschlossenen Patienten. Alter, Krankheitsdauer und die Dauer der Laquinimod-Behandlung stellen Mittelwerte mit Standardabweichung in Jahren dar. Bei Altersdurchschnitt, Krankheits- und Behandlungsdauer sind ebenfalls die Zeitspannen von Minimum bis Maximum in () angegeben.

Gruppe	♀ / ♂	Altersdurchschnitt	Krankheitsdauer	Laquinimod-Behandlung
Gesunde Donoren (<i>n</i> =15)	10/5	41,8 ± 8,4 (28-54)		
Unbehandelte Patienten mit MS (<i>n</i> =13)	11/2	36,6 ± 12,4 (24-60)	4,1 ± 3,6 (0,1-10)	
Laquinimod-behandelte Patienten mit MS (<i>n</i> =14)	10/4	40,8 ± 10,2 (28-57)	9,5 ± 4,2 (3-18)	4,2 ± 1,9 (1-7)

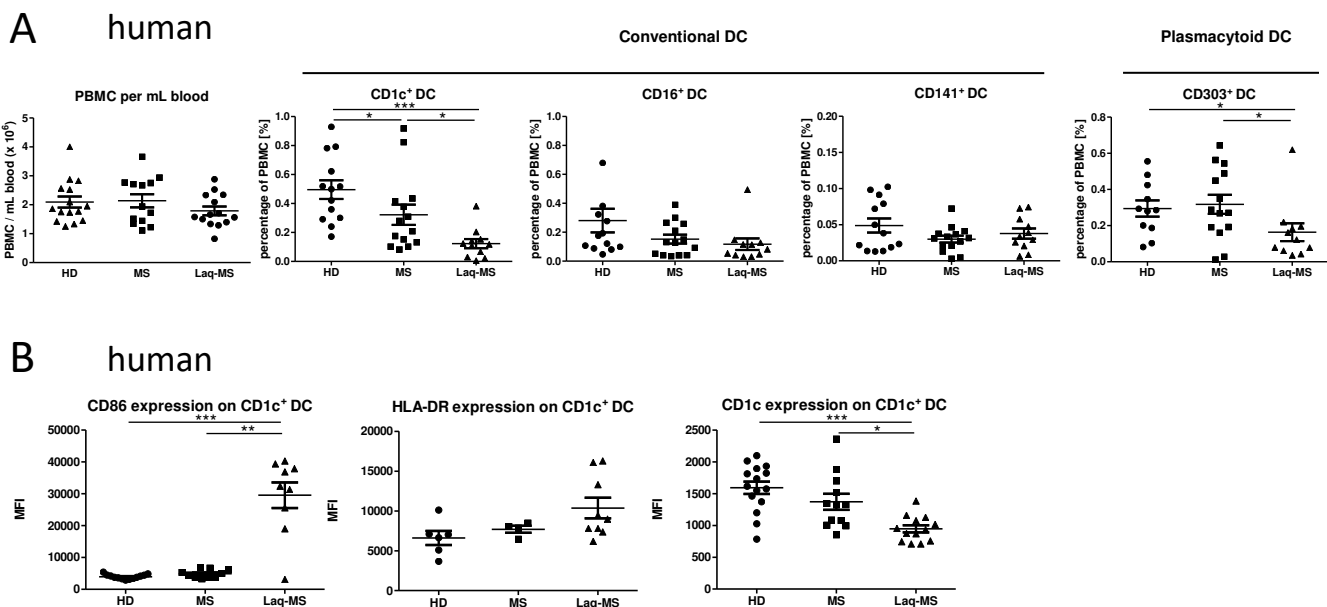


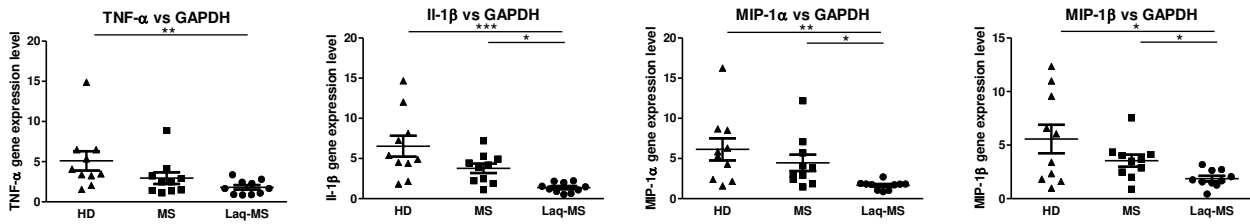
Abb. 10: Laquinimod beeinflusst die Expression von Oberflächenmolekülen auf Dendritischen Zellen. (A) Vergleich der absoluten Zellzahlen von humanen Mononukleären Zellen aus peripherem Blut von gesunden Spendern (HD), unbehandelten MS-Patienten (MS) und Laquinimod-behandelten MS-patienten (Laq-MS) pro Milliliter Vollblut. Und Vergleich der prozentualen Anteile von konventionellen DCs (CD1c⁺, CD16⁺ und CD141⁺) und plasmacytoiden DCs (CD303⁺) der unterschiedlichen Spendergruppen. Die Werte stellen Mittelwerte ± SEM dar (*n* ≥ 13). (B) Durchflusszytometrisch bestimmte Expression von CD86, HLA-DR (MHC II) und CD1c auf CD1c⁺ Dendritischen Zellen. Die Werte stellen Mittelwerte ± SEM dar (*n* ≥ 13). Die Daten repräsentieren die Induktionsrate der Proteinsekretion nach Stimulation mit LPS. Es werden die Mittelwerte ± SEM gezeigt (*n* ≥ 10), **P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001. DC = Dendritische Zellen.

Abb. 10 aus: (Jolivel et al., 2013)

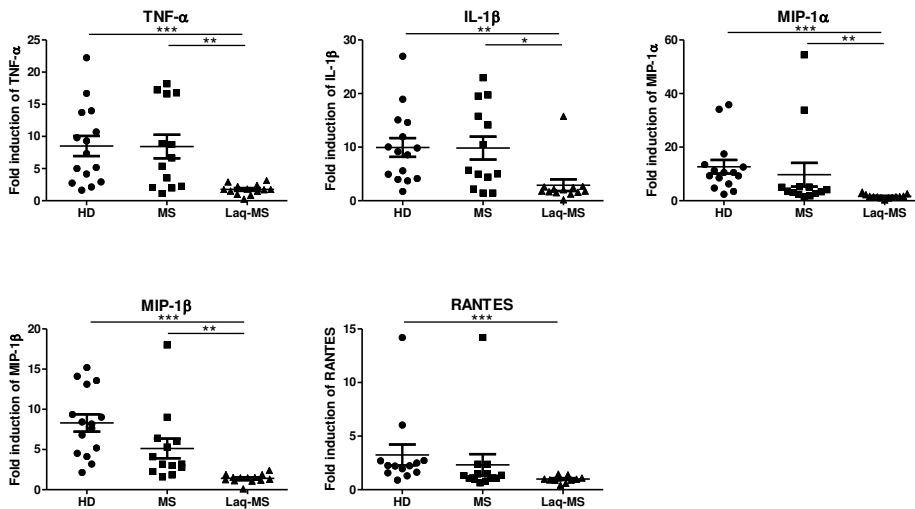
Die Genexpression von TNF- α , IL-1 β , MIP-1 α und MIP-1 β in maturen und immaturen CD1c⁺ DC wurde mit Hilfe der quantitativen PCR (qPCR) analysiert. Alle Gene zeigten eine geringere Expression auf DCs nach der Stimulation mit LPS, wenn sie aus Laquinimod-behandelten Patienten isoliert waren im Vergleich zu CD1c⁺ Zellen, die aus gesunden Probanden oder unbehandelten MS-Patienten isoliert worden waren. Generell war kein Unterschied in der Genexpression zwischen unbehandelten MS-Patienten und gesunden Probanden detektierbar (vgl. Abb. 11A). Die Ergebnisse waren in sich konsistent, unabhängig vom *house-keeping gene* (GAP-DH oder β -Actin). Die Analyse der β -Actin-Expression, normalisiert auf die GAP-DH-Expression zeigte keinen Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Dies zeigt, dass die gefundenen Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen in den unterschiedlichen Genexpressionen spezifisch sind (vgl. Abb. 11C).

Die Analyse der Zytokin- und Chemokin-Sekretion durch die kultivierten, immaturen und maturen CD1c⁺ DC unterstützt diese Ergebnisse. Die Sekretion von TNF- α , IL-1 β , MIP-1 α und MIP-1 β war, nach Stimulation mit LPS, zwischen gesunden Spendern und unbehandelten MS-Patienten gleich, jedoch signifikant reduziert bei Laquinimod-behandelten MS-Patienten. Des Weiteren war die RANTES-Sekretion in gesunden Spendern signifikant höher als in Laquinimod-behandelten MS-Patienten (vgl. Abb. 11B). Die Konzentration des Chemokins MIG war in diesen Experimenten nicht nachweisbar. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CD1c⁺ DC aus Laquinimod-behandelten Patienten eine signifikant reduzierte Reaktivität auf eine LPS-Stimulation besitzen.

A human



B human



C human

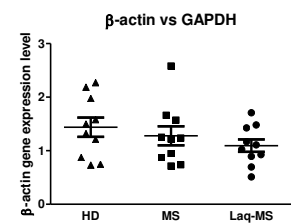


Abb. 11: Laquinimod beeinflusst die Cytokin- und Chemokinproduktion von DC *ex vivo*. (A) Niveau der Genexpression von Cytokinen (TNF-α, IL-1β) und Chemokinen (MIP-1α, MIP-1β) in isolierten konventionellen DCs (CD1c⁺) nach Stimulation mit LPS für 4 Stunden. Die Ergebnisse repräsentieren die Induktionsrate der Genexpression nach Stimulation mit LPS normalisiert auf die GAP-DH Expression als Haushaltsgen, dargestellt als Mittelwerte ± SEM (n = 10). (B) Aus Spendern isolierte CD1c⁺ Zellen wurden für 24h mit LPS stimuliert oder unstimuliert kultiviert. Die Überstände wurden entnommen und die Konzentrationen von Cytokinen (TNF-α, IL-1β) und Chemokinen (MIP-1α, MIP-1β) gemessen. (C) Relative β-Actin Expression normalisiert zur GAP-DH Expression in CD1c⁺ Zellen. Da sich die Werte zwischen den Gruppen nicht signifikant unterscheiden, konnten β-Actin und GAP-DH als Haushaltsgene verwendet werden. Die Werte stellen Mittelwerte ± SEM dar (n = 10). Die Daten repräsentieren die Induktionsrate der Proteinsekretion nach Stimulation mit LPS. Es werden die Mittelwerte ± SEM gezeigt (n ≥ 10), *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. DC = Dendritische Zellen, GAP-DH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

Abb. 11 verändert nach: (Jolivel et al., 2013)

3.2.7 Der biologische Effekt von Laquinimod wird durch die Inhibition des NF- κ B Signaltransduktionswegs in murinen und humanen DCs vermittelt

Zum besseren Verständnis der zellulären Mechanismen, die der Wirkung von Laquinimod unterliegen, wurden BMDC und MDDC *in vitro* unter Laquinimod-Behandlung und ohne Behandlung kultiviert. Die nach der Kultivierung der Zellen durchgeführte qPCR-Untersuchung von IKK β und NEMO ergab, dass die normalerweise einsetzende Hochregulation dieser Kinasen auf LPS-Stimuli durch die Zugabe von Laquinimod unterdrückt wurde (vgl. Abb. 12A+B). Diese beiden Kinasen sind für die Degradation von I κ B wichtig, einem Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Aufgrund dieser Daten nahmen wir Kontakt zum Institut für molekulare Medizin der Universitätsmedizin Mainz auf, um die mit Hilfe der qPCR erhobenen Daten auf Proteinebene zu untermauern. Hierzu wurden das Protein I κ B α (kanonischer NF- κ B Signaltransduktionsweg) sowie die Proteine p52 und p100 (nicht-kanonischer NF- κ B Signaltransduktionsweg) im Western Blot untersucht. Interessanterweise ergab die Proteinanalyse sowohl im Maus-, wie auch im Menschenmodell, dass die Menge an I κ B ansteigt, wenn die Zellen mit Laquinimod behandelt wurden (Jolivel, 2013). Dieses Protein ist ein wichtiger Regulator im kanonischen NF- κ B Signaltransduktionsweg, der dafür bekannt ist, die Transkription von zum Beispiel IL-1 β , TNF- α oder MIP-1 β zu fördern. Ebendies konnte in den vorhergehenden Versuchen gezeigt werden, dass die Laquinimod-Behandlung die Sekretion dieser Zytokine und Chemokine von DCs reduziert (vgl. Abb. 9A-C), und dass die entsprechenden mRNA-Level in Laquinimod-behandelten Patienten herunterreguliert waren (vgl. Abb. 11A).

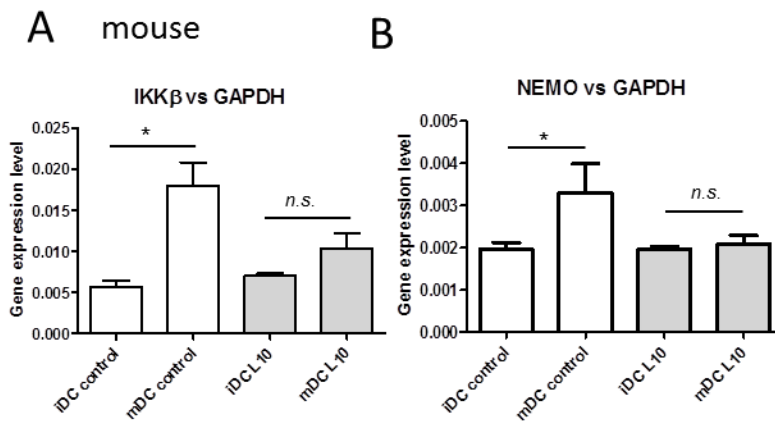


Abb. 12: Laquinimod beeinträchtigt den kanonischen NF-κB Signaltransduktionsweg. (A) Genexpression von IKKβ und (B) NEMO, bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH in knochenmarkstämmigen DC die während der Kultur mit 10 μM Laquinimod (L10) behandelt wurden oder unbehandelt (control) blieben. (n = 4 unabhängige Kulturen). *P < 0,05, n.s. = nicht signifikant.

Abb. 12 aus: (Jolivel et al., 2013)

In BMDC erhöhte der LPS-Stimulus die IL-1β Genexpression in unbehandelten Zellen signifikant, während der Anstieg in Laquinimod-behandelten Zellen nicht signifikant ausfiel (vgl. Abb. 13A). Bemerkenswerterweise zeigte die Untersuchung der IL-1R2 Genexpression eine starke Steigerung in immaturren und maturaen DCs, die mit Laquinimod behandelt wurden (vgl. Abb. 13B), während keine Veränderung der Genexpression von IL-1R1 feststellbar war (vgl. Abb. 13C). Die Expression von ICAM-1 ist ebenso durch den kanonischen NF-κB Signaltransduktionsweg reguliert, und es konnte gezeigt werden, dass – während ICAM-1 in Kontrollzellen nach LPS-Stimulus stark hochreguliert wurde – eine Hochregulation von ICAM-1 nach LPS-Stimulus durch die Behandlung mit Laquinimod vollkommen unterdrückt wurde (vgl. Abb. 13D). Dies könnte die verringerte Fähigkeit der BMDC erklären, in der Kokultur mit 2D2 T-Zellen, diese zu T_H1-Zellen zu polarisieren.

Die Analyse des nicht-kanonischen Signaltransduktionswegs ergab, dass auch dieser durch die Laquinimod-Behandlung verändert wurde, indem die Degradation von p100 zu p52 stark vermindert war (vgl. (Jolivel et al., 2013)).

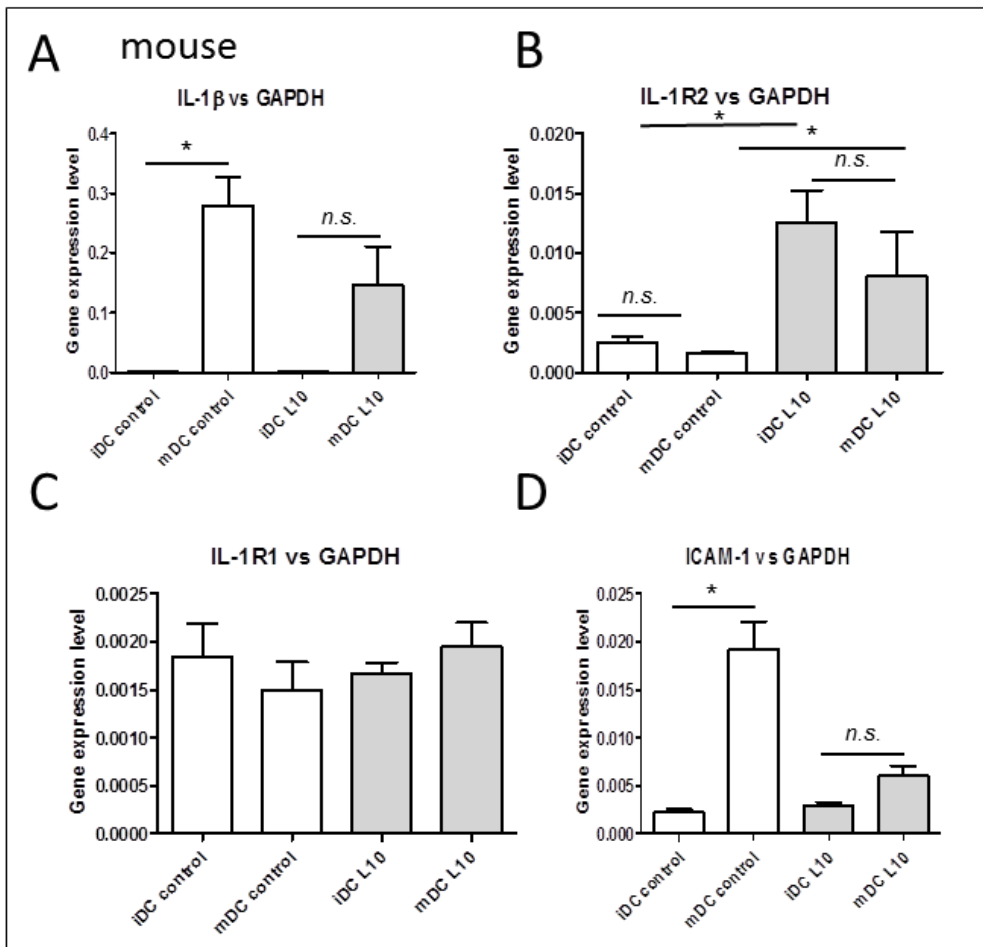


Abb. 13: Laquinimod beeinträchtigt die Genexpression von IL-1 β und den Oberflächenmolekülen IL-1R1, IL-1R2 und ICAM-1. (A) Genexpression von IL-1 β (B) IL-1R2, (C) IL-1R1 und (D) ICAM zum Haushaltsgen GAP-DH in knochenmarkstämmigen DC nach Behandlung mit 10 μ M Laquinimod (L10) und ohne Behandlung (control). *P < 0,05, n.s. = nicht signifikant.

Abb. 13 verändert nach: (Jolivel et al., 2013)

4 Diskussion

4.1 Wirkung von Cladribin auf DCs

Cladribin, war für einen kurzen Zeitraum zur Therapie von MS zugelassen. Inzwischen wird es nur noch zur Therapie hämatologischer Krebserkrankungen eingesetzt (Beutler, 1992). Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass Cladribin nicht nur Lymphozyten sondern auch Microglia und Monozyten (Kopadze, Dobert, Leussink, Dehmel, & Kieseier, 2009; Singh et al., 2012) beeinflusst. Auf diesen Befunden aufbauend sollten die hier durchgeführten Experimente zeigen, ob Cladribin auch einen Einfluss auf DCs ausübt. Dies ist besonders deshalb interessant, weil DCs immer weiter in den Fokus der Therapie von malignen Krankheiten rücken (Anguille, Willeman, Lion, Smits, & Berneman, 2012) und eine zentrale Rolle in der Initiation und Progression autoimmuner Krankheiten spielen (Steinman, 2007).

4.1.1 Wirkung von Cladribin auf das Überleben von DCs *in vitro*

Cladribin ist vor allem deswegen so effektiv, weil es hauptsächlich eine pro-apoptotische Wirkung auf Lymphozyten hat (Seto et al., 1985). Dabei spielt das Verhältnis zweier Enzyme eine besondere Rolle. Denn erst in phosphorylierter Form kann Cladribin seine pro-apoptotische Wirkung in der Zelle entfalten. Die Phosphorylierung wird durch das Enzym Deoxycytidinkinase katalysiert (Beutler, 1992). Das zytoplasmatische Enzym Enzym 5'-Deoxynucleotidase kann die Phosphorylierung rückgängig machen (Lotfi, Juliusson, & Albertioni, 2003), indem es aktiviertes Cladribin dephosphoryliert. Daher beruht letzten Endes die Zytotoxizität von Cladribin auf dem Verhältnis der beiden antagonistischen Enzyme dCK und 5-NT (Bontemps et al., 2006).

Mit Hilfe eines qPCR-Ansatzes wurde die Genexpression der beiden Enzyme bestimmt und das Expressionsverhältnis berechnet. Im Vergleich zu Lymphozyten, die als sehr sensibel gegenüber Cladribin bekannt sind, wurde in den hier durchgeführten Experimenten ein weitaus geringeres Verhältnis von dCK zu 5-NT in murinen DCs nachgewiesen. Dies legt eine weitaus geringere Suszeptibilität von DCs gegenüber Cladribin nahe. Im Vergleich des Expressionsverhältnisses beider Enzyme bei immaturren und maturaen BMDCs konnte kein Unterschied festgestellt werden. Dieses Ergebnis passt zu den kürzlich veröffentlichten Daten der gleichen Expression von dCK in humanen immaturren und maturaen DCs. Auch wenn das Verhältnis der beiden Enzyme keinen stark zytotoxischen Effekt von Cladribin nahe legt (Singh,

Chittappen, et al., 2013), konnte in den hier durchgeführten Experimenten eine mit steigender Konzentration abnehmende Zellausbeute bei humanen MDDCs unter Cladribin-Behandlung festgestellt werden, wie es auch von Singh et al. berichtet wurde (Singh, Chittappen, et al., 2013). Erwähnenswert ist auch, dass humane Zellen deutlich sensibler auf Cladribin reagieren, da die Zellausbeute bereits bei deutlich niedrigeren Cladribin-Konzentrationen vermindert ist, als es bei murinen DCs der Fall ist. In diesem Zusammenhang wurde von einer Arbeitsgruppe berichtet, dass Menschen Cladribin in höherem Maße metabolisieren, als dies Mäuse tun (Wu, McKown, Moyer, & Cheung, 2004). Dies zeigt, dass enzymatische Aktivitäten zwischen verschiedenen Spezies unterschiedlich sein können, was sehr gut die unterschiedliche Suszeptibilität ähnlicher Zelltypen in Mensch und Maus erklären könnte.

Zusätzlich zu den Studien, die die apoptotische Wirkung von Cladribin in hohen Dosen auf menschliche DCs zeigen (Singh, Prajeeth, et al., 2013), existieren einige Studien, die einen immunmodulatorischen Effekt von Cladribin nahelegen. Ob ein solcher immunmodulatorischer Effekt durch die Einwirkung von Cladribin auf DCs zustande kommen kann, sollten die hier durchgeführten Experimente zeigen. Hierzu wurden Cladribin-Konzentrationen von 2,5 – 7,5 nM für humane DCs und Konzentrationen im Bereich von 2,5 – 100 nM für murine DCs eingesetzt. In klinischen Studien und in der Behandlung von Haarzelleukämie wird Cladribin in Dosen von 0,07 und 0,14 mg/kg/Tag eingesetzt (Girardi et al., 2012; J Liliemark & Peterson, 2005), was einer *steady-state* Serumkonzentration von 22,5 nM bei einer Dosis von 0,14 mg/kg/Tag – wie pharmakokinetische Studien zeigten (Bagnato & Pirko, 2011; J. Liliemark & Juliusson, 1991) – entspricht. Daher kann angenommen werden, dass die in dieser Studie eingesetzten Konzentrationen von Cladribin der Serumkonzentration in Patienten in der *steady-state* Phase entsprechen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die niedrigen nanomolaren Dosen, die in den hier durchgeführten Experimenten eingesetzt wurden, die Lebensfähigkeit der DCs nicht beeinträchtigten, wie die Todzellfärbungen mit PI bestätigten.

4.1.2 Cladribin verändert den Phänotyp maturer DCs

Da die *in vitro* generierten Zellen über die gesamte Zeit der Kultivierung mit Cladribin behandelt worden sind, könnte diese Behandlung einen Effekt auf die Differenzierung der DCs gehabt haben. Die durchflusszytometrische Färbung des für DCs spezifischen Oberflächenmoleküls CD11c ergab keine Unterschiede zwischen behandelten und

unbehandelten Zellen, sowohl im humanen, wie im murinen Modellsystem. Daraus kann geschlossen werden, dass Cladribin den Differenzierungsprozess der DCs nicht beeinträchtigte.

Ein wichtiges Merkmal zur Charakterisierung von DCs ist die Expression von verschiedenen Aktivierungsmarkern. Innerhalb dieser Oberflächenmoleküle war die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 in murinen und humanen, Cladribin-behandelten DCs konsequent erhöht. Hingegen war die Expression des Oberflächenmoleküls MHC II nur in den maturen, Cladribin-behandelten DCs erhöht. Die erhöhte Expression von CD86 wurde mit der Toleranzinduktion semi-maturer DCs in Verbindung gebracht (Steinman, 2007). Solche semi-maturen DCs zeigten eine protektive Wirkung im Tiermodell der autoimmunen Rheumatoiden Arthritis (Stoop et al., 2010) wie auch im Tiermodell der MS (Papenfuss et al., 2011).

Zusätzlich legen die Hochregulation des Maturierungsmarkes CD83 und die verminderte Phagozytose von Antigenen immaturer humaner DCs nahe, dass Cladribin den Maturierungsprozess von DCs beeinflusst.

4.1.3 Cladribin verringert die Chemokin- und Zytokinproduktion von DCs

DCs sind bekannt als wichtige Quelle für Chemokine (McColl, 2002). Diese Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsherden (Oppenheim, Zachariae, Mukaida, & Matsushima, 1991). Die hier durchgeführten Experimente zeigten eine Änderung der Chemokinsekretion durch DCs unter Cladribin-Behandlung. So sezernierten mature murine BMDCs weniger MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-1, während mature humane MDDCs weniger MIP-1 α , MIP-1 β und MIG ins Kulturmedium abgaben. Bei Lymphomen konnte die Verbindung zwischen der Plasmakonzentration von MIP-1 α und einem erhöhten Sterblichkeitsrisiko hergestellt werden, was MIP-1 α als möglichen prognostischen Marker in die Diskussion brachte (Sivina et al., 2011). Im Fall des autoimmunen Diabetes mellitus Typ 1 scheinen die Chemokine MIP-1 α , MCP-1 und MIG eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Insulitis im Pankreas zu spielen, die von autoreaktiven T_H1 Zellen gebildet werden kann. Auch im Verlauf der MS scheint MIP-1 α eine wichtige Rolle zuzukommen. So zeigten Studien, dass die Konzentration von MIP-1 α im CSF während eines MS-Schubes signifikant erhöht ist, verglichen mit CSF von Patienten mit nicht-inflammatorischen neurologischen Erkrankungen (Miyagishi, Kikuchi, Fukazawa, & Tashiro, 1995). Für MIG konnte eine direkte Wirkung auf den

Verlauf der MS gezeigt werden, durch die Anlockung CXCR3-exprimierender, aktivierter T-Zellen zu Entzündungsherden im ZNS (Sorensen et al., 1999). Eine erhöhte Expression von MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-1 konnte auch in MS-Läsionen und um diese Läsionen im ZNS herum gezeigt werden (Simpson, Newcombe, Cuzner, & Woodroffe, 1998), insbesondere in den perivaskulären Zellen (McManus et al., 1998; Simpson et al., 1998). Da DCs dafür bekannt sind, sich besonders um Gefäße herum zu platzieren (Prodinger et al., 2011), könnten DCs eine wichtige Quelle der Produktion von Chemokinen im Krankheitsbild der MS darstellen. Die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und MIG scheinen eine wichtige Rolle im Verlauf der MS zu spielen, da durch die Verwendung von anti-Chemokin Antikörpern im murinen Modell sowohl die Entwicklung einer EAE, als auch die Infiltration des ZNS durch Monozyten verhindert werden konnte (Karpus et al., 1995; Manczak, Jiang, Orzechowska, & Adamus, 2002). In Übereinstimmung zu den hier erzielten Ergebnissen wurden verringerte Chemokinkonzentrationen im CSF von Cladribin-behandelten MS-Patienten nachgewiesen (Bartosik-Psujek et al., 2004).

Die verringerte Chemokinsekretion hat auch eine funktionelle Auswirkung, was die durchgeführten Migrationsexperimente bestätigten. So war die Migration humaner CD14⁺ Monozyten deutlich verringert, wenn die Kulturüberstände von Cladribin-behandelten MDDCs stammten. Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass DCs unter Cladribin-Behandlung in geringerem Maße Immunzellen zu Entzündungsherden locken können und Cladribin somit einen immunmodulatorischen Effekt ausübt.

Zu den Chemokinen spielen auch von DCs sezernierte Zytokine eine wichtige Rolle bei der Initiation einer Immunantwort, da diese sowohl die Aktivierung als auch die Differenzierung von T-Zellen beeinflussen. In den hier durchgeführten Experimenten wurde eine signifikant reduzierte Sekretion von TNF- α und IL-1 β durch humane und murine mature DCs nachgewiesen. Beide Zytokine gelten als pro-inflammatorisch und werden mit neurodegenerativen Prozessen im ZNS im Modell der EAE in Verbindung gebracht (Centonze et al., 2009; Rossi et al., 2010). IL-1 β hängt mit der Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H17-Zellen zusammen. In der Maus synergisiert es mit IL-6 und IL-23 bei der Induktion von T_H17-Zellen (Chung et al., 2009), im Menschen ist IL-1 β für die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H17-Zellen unabdingbar (Hebel et al., 2011). Durch die Reduktion von TNF- α , aufgrund der Behandlung der DCs mit Cladribin, verringert sich nicht nur der direkte toxische Effekt von

TNF- α sondern auch die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion durch die Rekrutierung von Immunzellen (Skarica et al., 2009).

Zusammen mit dem Ergebnis der Hochregulation des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf murinen und humanen DCs unter Cladribin-Behandlung legen die Ergebnisse nahe, dass der therapeutische Effekt von Cladribin auf der Förderung eines semi-maturen tolerogenen DC-Phänotyps beruht. Die weitere Differenzierung der DCs scheint blockiert.

4.1.4 Cladribin verändert die T-Zell polarisierende Funktion von DCs

Hauptfunktion der DCs im Immunsystem ist die Aktivierung von T-Zellen, um eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort zu initiieren. Zur Untersuchung der Wirkung von Cladribin auf diese zentrale Funktion der DCs wurden Kokultorexperimente zwischen BMDCs und murinen 2D2 T-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung von BMDCs mit 7,5 nM Cladribin dazu führte, dass T-Zellen dazu angeregt wurden, vermehrt IL-10 und signifikant weniger TNF- α und IFN- γ zu produzieren.

Die Zytokine TNF- α und IFN- γ werden mehrheitlich dem T_H1 Phänotyp zugeschrieben, der als proinflammatorisch gilt. Dagegen wird IL-10 vornehmlich von T_{reg}-Zellen sezerniert, deren regulatorische Eigenschaften bereits beschrieben wurden (Jonuleit, Schmitt, Schuler, Knop, & Enk, 2000). Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung von DCs mit Cladribin nicht nur deren Zytokin- und Chemokinprofil verändern. Des weiteren wirkt Cladribin auf DCs insoweit verändernd, als dass diese naive T-Zellen eher zu T_H17-Zellen differenzieren lassen. Auch hier ist demnach eine immunmodulatorische Wirkung von Cladribin nachweisbar, als dass eher eine Toleranz induziert wird, als dass die DCs proinflammatorisch wirken.

Zusammengenommen entfaltet Cladribin seine immunmodulatorische Wirkung auf vielfältige Weise: zum einen, indem weniger Chemokine produziert wurden, die den Krankheitsverlauf von MS verstärken (MIP-1 α , MIP-1 β und MIG), beziehungsweise die den Verlauf einer EAE ungünstig beeinflussen (MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-1). Des weiteren, indem signifikant weniger proinflammatorische Zytokine von Cladribin-behandelten humanen und murinen DCs sezerniert (TNF- α , IL-1 β) wurden, was funktionell zu einer signifikant reduzierten Chemoattraktion auf CD14⁺ Monozyten bei murinen DCs führte. Zuletzt wirkte Cladribin auf die Polarisation von naiven T-Zellen durch behandelte murine DCs, indem sich naive T-Zellen eher zu T_H17-Zellen differenzierten. Obwohl Cladribin nicht mehr für die Behandlung von MS zugelassen ist, unterstützen diese Ergebnisse die positive Beeinflussung des Verlaufs von MS

durch Cladribin. Daher wäre ein Einsatz von Cladribin in geringer Dosierung, unter Umständen in Kombination mit einem weiteren immunmodulatorischen Präparat, zu diskutieren.

4.2 Wirkung von Laquinimod auf DCs

Die Wirkung von Laquinimod ist dosis-abhängig. und die orale Gabe von 25 mg/kg konnte den Krankheitsverlauf der EAE in C57BL/6 Mäusen, die mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert worden waren, konnte durch die orale Gabe von 25 mg/kg Laquinimod signifikant abgemildert werden (Runstrom, Leanderson, Ohlsson, & Axelsson, 2006; Wegner et al., 2010). Dr. Valerie Jolivel und Dr. Youmana Masri verifizierten diese Daten im Labor der Klinik für Neurologie und wählten anschließend ein Modell für eine schubhaft verlaufende Form der MS, indem sie SJL-Mäuse mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ immunisierten (McRae et al., 1992). Dieses Modell sollte die Situation der Patienten möglichst gut nachbilden. In einer ersten Versuchsreihe wurde Laquinimod präventiv verabreicht. Hierdurch waren die Mäuse gänzlich resistent gegenüber der Induktion einer EAE. Bei Gabe von Laquinimod nach dem Abklingen des ersten Schubes, wurde ein zweiter Schub wirkungsvoll verhindert (Jolivel et al., 2013). Dies zeigt, dass dieser Effekt nicht stamm- oder modellabhängig ist. In diesem MS-Modell könnte Laquinimod entweder die Reduktion der T-Zellen aus dem ZNS in der Erholungsphase beschleunigen (Di Rosa et al., 2000) oder eine zweite Welle der Einwanderung von Lymphozyten in das Gehirnparenchym verhindern (Jolivel et al., 2013). In klinischen Studien fiel der Effekt von Laquinimod bei Rückfällen allerdings deutlich geringer aus (ALLEGRO- und BRAVO-Studie), als dies durch die von Jolivel et al., 2013 gezeigten Daten zu erwarten war. Interessanterweise konnte ein dosis-abhängiger Effekt von Laquinimod auf die Rückfallquote und die Entwicklung von MRT-Läsionen in einer Studie der Phase II (Comi et al., 2008) gezeigt werden. Die Diskrepanz zwischen murinen und humanen Studien könnte allerdings auf die unterschiedliche Dosierung von Laquinimod in den beiden Systemen zurückzuführen sein (25 mg/kg murin versus 0,008 mg/kg human). Dies lässt darauf schließen, dass höhere Dosen von Laquinimod in Menschen die Effizienz in der Unterdrückung von Rückfällen verbessern könnten. Um diese Hypothese zu testen, legt der Medikamentenhersteller gerade eine klinische Studie der Phase III auf (CONCERTO-Studie), in der die Wirkung von Laquinimod in zwei erhöhten Dosen (0,6 mg und 1,2 mg täglich) bei 1800 Patienten mit schubhaft verlaufender MS über 24 Monate untersucht werden soll.

4.2.1 Laquinimod verändert die Chemokinproduktion der DCs

DCs nehmen innerhalb der professionellen antigen-präsentierenden Zellen nicht nur die zentrale Stellung ein, sondern sind auch im Prozess der T-Zelldifferenzierung und Induktion von Toleranz die Hauptakteure. Ferner sind DCs eine wichtige Quelle von Chemokinen (McColl, 2002). Die hier durchgeführten Experimente zeigten, dass Laquinimod-behandelte BMDC weniger MIP-1 α produzierten und sezernierten. Ebenso verminderte Laquinimod die Produktion von MIP-1 α , MIP-1 β und MIG bei MDDC, nach Stimulation mit LPS, signifikant. Außerdem konnte eine verminderte Sekretion der Chemokine MIP-1 α und MIP-1 β durch konventionelle CD1c⁺ DCs, die aus Laquinimod-behandelten Patienten isoliert und mit LPS stimuliert worden waren, gezeigt werden. Bemerkenswerterweise konnte festgestellt werden, dass bereits auf mRNA-Ebene eine Regulation durch Laquinimod stattfindet. Dies legt nahe, dass Laquinimod bereits die Transkription der DNA beeinflusst, was auf einen Einfluss auf den wichtigen NF- κ B Signaltransduktionsweg hindeutet. MIP-1 α und MIP-1 β sind maßgeblich an der Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsherden beteiligt (Oppenheim et al., 1991). Außerdem scheint ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Chemokinexpression im ZNS und neurologischer Dysfunktion zu bestehen, wie bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen veröffentlicht (Glabinski, Tuohy, & Ransohoff, 1998). Verschiedene Gruppen fanden bei Untersuchung des Chemokinmilieus in und um MS-Läsionen im Gehirn die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β erhöht, besonders in perivaskulären Zellen (Berman, Guida, Warren, Amat, & Brosnan, 1996; McManus et al., 1998; Simpson et al., 1998). Diese erhöhte Chemokinproduktion könnte ihre Ursache darin haben, dass DC besonders um die Gefäße herum lokalisiert sind (Prodinger et al., 2011) und als einschlägige Quelle von Chemokinen bei der EAE und in der MS fungieren könnten. Durch Versuche mit neutralisierenden Antikörpern gegen MIP-1 α konnte dessen besondere Rolle im Krankheitsverlauf gezeigt werden. Der Einsatz von anti-MIP-1 α Antikörpern in der EAE verhinderte vollkommen die Entwicklung der Krankheit und unterband ebenso die Einwanderung von mononukleären Zellen ins ZNS (Karpus et al., 1995; Manczak et al., 2002).

Interessanterweise wurde auf PBMCs von gesunden Spendern, nach einer Behandlung mit Laquinimod, eine reduzierte Expression des MIP-1 α Rezeptors CCR1 nachgewiesen (Gurevich et al., 2010). Dies würde die Hemmung des MIP-1 α -CCR1 Signaltransduktionswegs durch Laquinimod weiter verstärken. Diese reduzierte Expression des CCR1 könnte Laquinimod-induziert sein, da die von DCs produzierten Chemokine nicht nur eine Rolle bei der

Rekrutierung von anderen Immunzelltypen haben, sondern auch eine autokrine Funktion haben könnten. Es konnte in diesem Zusammenhang bereits gezeigt werden, dass DCs ihre eigenen Rezeptoren triggern und herunterregulieren können (Sallusto et al., 1999). Durch die hier durchgeführten Experimente konnte die funktionelle Relevanz erniedrigter Chemokinsekretion bei der Chemoattraktion von Monozyten gezeigt werden, was als essentieller Schritt in der Pathogenese der EAE angesehen wird (Ajami, Bennett, Krieger, McNagny, & Rossi, 2011). Bemerkenswert ist auch, dass im ZNS von Mäusen, die mit suboptimalen Dosen von Laquinimod behandelt wurden (0.75 mg/kg), die Zahl der Makrophagen im Gehirn reduziert war (Thone et al., 2012). Subsummiert man all diese Ergebnisse, so könnte die erniedrigte Sekretion von Chemokinen durch Laquinimod-behandelte DCs die Ursache für die verminderte Rekrutierung von Immunzellen ins ZNS sein.

4.2.2 Laquinimod verändert die Zahlenverhältnisse der DC-Subsets

DCs zeichnen sich durch ihre Vielfalt aus. So existieren verschiedene Untergruppen mit unterschiedlichen Funktionen. Traditionell werden DCs nach den auf ihrer Oberfläche exprimierten Molekülen klassifiziert. So können murine DCs aus der Milz durch unterschiedliche Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 unterschieden werden (Vremec, Pooley, Hochrein, Wu, & Shortman, 2000). Laquinimod kann die Expression der Oberflächenmoleküle beeinflussen, wie es die Gruppe um Schulze-Topphoff (2012) bei der Minimierung der CD4⁺ DCs in der Milz nachgewiesen hat. Diese Ergebnisse konnten mit den in Kooperation mit der Hautklinik durchgeführten durchflusszytometrischen Experimenten bestätigt werden. Dieser Effekt konnte auch für Paquinimod, ebenso wie Laquinimod ein Chinolon-3-Carboxamid-Derivat, gezeigt werden (Stenstrom, Anderson, Eroukhmanoff, Leanderson, & Ivars, 2010). Dieses wird im Moment in der klinischen Erprobungsphase für die Behandlung von Systemischem Lupus erythematodes eingesetzt. Die Reduktion der CD4-Expression auf milzstämmigen DCs durch Laquinimod ist nicht die einzige Veränderung, die beobachtet werden kann. Auf konventionellen CD8⁺ DCs konnte auch eine signifikante Reduktion der CD8-Expression auf der Oberfläche beobachtet werden. Dies muss nicht zwingend im Differenzierungsprozess der DCs stattgefunden haben. In einem Modell der viralen Antigeninjektion konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD4 und CD8 nicht statisch ist, sondern sich auch nach der Antigenfreisetzung noch ändern kann (Moron, Rueda, Casal, & Leclerc, 2002). Außerdem wird angenommen, dass die CD8-Expression und die IL-12-Sekretion korrelieren (Hochrein et al., 2001), was teilweise erklären könnte, warum DCs unter

Laquinimod-Behandlung eine geringere Fähigkeit zur Initiierung einer T_H1 -Immunantwort besitzen, da IL-12 das Hauptzytokin für eine T_H1 -Antwort ist (Trinchieri, 1998). Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass bei der intrazellulären Färbung von IL-12/IL-23p40 in milzstämmigen $CD11c^+$ DCs aus Laquinimod-behandelten Mäusen eine Reduktion beobachtet werden konnte (Schulze-Toppoff et al., 2012).

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente war es möglich, konventionelle $CD1c^+$ DCs aus humanen PBMCs zu isolieren. Dabei konnte eine signifikante Reduktion konventioneller $CD1c^+$ DCs innerhalb der PBMCs von Laquinimod-behandelten Patienten zu unbehandelten Patienten und gesunden Probanden gezeigt werden. Eine aktuelle Studie zeigte phänotypische und funktionelle Gemeinsamkeiten in der Zytokinsekretion und der Induktion von allogenen $CD4^+$ T-Zellantworten zwischen humanen DC Subsets im Blut und in der Milz (Mittag et al., 2011), die unter Umständen Pendant zu den milzstämmigen DCs der Maus sein könnten (Mittag et al., 2011; Robbins et al., 2008). Für die hier durchgeführten Experimente wird angenommen, dass die humanen $CD1c^+$ konventionellen DCs ein Äquivalent zu den murinen $CD8^+CD11b^+$ milzstämmigen DCs sind. Diese Annahme lässt den Schluss zu, dass die Haupteffekte von Laquinimod auf murine milzstämmige DC Subsets auf die Situation in Patienten übertragen werden könnten.

In Laquinimod-behandelten Patienten konnte auf konventionellen DCs eine signifikante Reduktion von $CD1c$ nachgewiesen werden. Da das $CD1c$ -Molekül auf dem Hauptsubset konventioneller DCs im menschlichen Blut exprimiert wird, welches eine T_H1 -polarisierte T-Zellantwort induziert (Dzionek et al., 2000), könnte Laquinimod hier eine immunmodulatorische Wirkung haben, indem naive T-Zellen weniger zu T_H1 -Zellen differenzieren. Das $CD1c$ -Molekül gehört zu einer Proteinfamilie, die Lipidantigene präsentieren (Skold & Behar, 2005). Obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass Myelinproteine die Immunantwort im Verlauf der MS auslösen, zeigten neuere Daten, dass auch Lipidantigene potentielle Verursacher der Immunantwort sein könnten (Kanter et al., 2006).

Laquinimod veränderte weiterhin die Expression des Oberflächenmoleküls $CD86$ auf konventionellen DCs durch Laquinimod *in vivo* in Mäusen und MS-Patienten. Die MFI von $CD86$ war sowohl in murinen milzstämmigen DCs als auch in humanen $CD1c^+$ DCs aus dem peripheren Blut erhöht. Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei Monozyten in Laquinimod-

behandelten Mäusen gezeigt werden (Thone et al., 2012). CD86 steht im Zusammenhang mit T_H2 -Immunantworten (Kuchroo et al., 1995; Weber et al., 2007) und der Induktion von oraler Toleranz unter geringen Dosen in der EAE (Liu, Ferguson, Cooper, Grady, & Willis, 1999), wohingegen CD40 und CD80 als kostimulatorische Moleküle in der T_H1 -Antwort involviert sind. Demgemäß wurde ein Zusammenhang zwischen der Hochregulation von CD86 auf „semi-maturen“ DCs und der Induktion von Toleranz beschrieben (Lutz & Schuler, 2002). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Östriol, ein Schwangerschaftshormon mit therapeutischem Effekt in der Behandlung von MS (Sicotte et al., 2002), die Expression von CD86 auf konventionellen DCs hochreguliert, was vor der Entwicklung einer EAE schützt und somit ebenfalls Toleranz induziert (Papenfuss et al., 2011). Aus der Beobachtung, dass Laquinimod in Patienten konventionelle $CD1c^+$ DCs mit hochregulierter CD86-Expression hervorruft, ließe sich schließen, dass die Wirkung von Laquinimod durch die Induktion von semi-maturen tolerogenen DCs, deren Entwicklung in diesem Stadium arretiert ist, vermittelt wird. *In vitro* war allerdings eine erniedrigte Expression von CD86 nach der Stimulation von MDSCs mit LPS unter Behandlung mit Laquinimod nachweisbar. Dieses gegenläufige Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass die Veränderung der Expression von CD86 von den Maturierungsstimuli abhängig ist. So könnten unterschiedliche Stimuli zum einen zu semi-maturen tolerogenen DCs oder zum anderen zu maturen immunogenen DCs führen. Daraus wäre zu folgern, dass Laquinimod in MS-Patienten einen semi-maturen DC-Phänotyp mit erhöhter CD86-Expression hervorbringt, die allerdings in ihrer Differenzierung so blockiert sind, dass sie sich nach einem Stimulus mit LPS nicht zu maturen immunogenen DCs entwickeln können. Die verringerte Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen von konventionellen DCs nach der Stimulation durch LPS könnte diese Erklärung unterstützen. Allerdings kann mit den hier durchgeführten Experimenten nicht ausgeschlossen werden, dass die Modulation der CD86-Expression durch Laquinimod zwischen den verschiedenen Untergruppen konventioneller DCs, die *in vivo* und *in vitro* untersucht wurden, unterschiedlich ist.

4.2.3 Laquinimod wirkt auf DCs durch die Veränderung des NF- κ B Signaltransduktionswegs

Die nächstliegende Ursache für die beobachteten Änderungen in DCs könnte die Hemmung des NF- κ B Signaltransduktionswegs sein, weil die molekularen Komponenten dieses Signaltransduktionswegs [Rel A, Rel B, c-Rel, p50 (NF- κ B1) und p52 (NF- κ B2)] stark exprimiert werden und im Zellkern der DCs akkumulieren (Granelli-Piperno, Pope, Inaba, & Steinman,

1995; Neumann et al., 2000). Hinzu kommt, dass I κ B α und I κ B ϵ während der Reifung von DCs ebenfalls hochreguliert sind (Neumann et al., 2000). Die Reifung von DCs zu maturen DCs kann durch verschiedene Stimuli initiiert werden, die zur Aktivierung unterschiedlicher NF- κ B Untereinheiten führen (S. Hofer et al., 2001). Die durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass der kanonische NF- κ B Signaltransduktionsweg im murinen System durch Laquinimod beeinträchtigt wird (vgl. Abb. 12). Dies deckt sich mit den hier erzielten Ergebnissen der veränderten Chemokin- und Zytokinsekretion der DCs, da die Transkriptionsfaktoren des NF- κ B Weges die Expression verschiedener immunogener und inflammatorischer Gene beeinflussen. Darunter fallen auch Gene zur Produktion von Interleukinen und Chemokinen. Die Hemmung der Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern verhindert die weitere Reifung der DCs. Dadurch unterbleibt die Induktion einer T-Zelldifferenzierung (Rescigno, Martino, Sutherland, Gold, & Ricciardi-Castagnoli, 1998; Tas et al., 2005). Bemerkenswert ist, dass bereits die 24-stündige Behandlung von PBMCs aus unbehandelten MS-Patienten und gesunden Spendern mit Laquinimod *in vitro* zu einer veränderten Expression von Faktoren des NF- κ B Signaltransduktionswegs führt (Gurevich et al., 2010). Vor allem waren ein NF- κ B Inhibitor (NF- κ BIE) überexprimiert und das in die Ubiquitinylierung von NF- κ BIE involvierte Protein BTRC supprimiert. NF- κ BIE inaktiviert NF- κ B und verhindert dessen Translokation in den Zellkern. Weitere Untersuchungen zeigten, dass viele Gene, die vom Transkriptionsfaktor NF- κ B abhängig sind, unter Laquinimod-Behandlung herunterreguliert waren. Dies betraf CXCL9, LY9 und ICAM-1 (Gurevich et al., 2010). ICAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül, das im Zuge der Reifung von DCs hochreguliert (Grauer et al., 2002) und auch von spinal perivaskulären Makrophagen während der EAE stark exprimiert wird (Hofmann et al., 2002). ICAM-1 bindet an LFA-1 und Mac-1 und könnte daher sowohl an der Aktivierung als auch der Extravasation von Leukozyten beteiligt sein (Samoilova, Horton, & Chen, 1998).

Ein Einfluss von Laquinimod auf den NF- κ B Signaltransduktionsweg wurde in einer aktuellen Studie auch in Bezug auf murine Astrozyten nachgewiesen (Bruck et al., 2012).

Der NF- κ B Signaltransduktionsweg kann von LPS und IL-1 β aktiviert werden, indem sie an ihren jeweiligen Rezeptor TLR4, bzw. IL-1R1 binden. In den hier durchgeführten Versuchen konnte eine Erhöhung der Genexpression von IL-1R2 durch Laquinimod in BMDC nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob die Zellen immatur waren oder durch LPS maturiert wurden.

Im Gegensatz dazu blieb die Expression von IL-1R1 unter Laquinimod-Behandlung unverändert. IL-1R2 bindet IL-1 β , zieht jedoch keine Signaltransduktionskaskade nach sich. Dadurch verhindert IL-1R2 eine Entzündungsreaktion (Dinarello, 2011). Der Rezeptor IL-1R2 wurde bereits in Bezug auf die Wirkung von Glucocorticoiden und deren anti-inflammatorischen Effekt in klinischen Studien betrachtet (Vambutas et al., 2009).

4.2.4 Laquinimod verringert die Stimulation von T-Zellen durch DCs

Eine reduzierte Anzahl von T-Zellen im ZNS könnte aus einer verringerten T-Zellaktivierung und Proliferation resultieren. In den hier durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei der gemeinsamen Kultivierung von humanen T-Zellen und Laquinimod-behandelten, maturen MDDCs *in vitro* die T-Zellproliferation signifikant reduziert war. Es kann angenommen werden, dass Laquinimod die stimulatorische Kapazität von DCs auf T-Zellen verringert. Diese Stimulation ist unabdingbar für das Überleben enzephalitogener T-Zellen während der Effektorphase der Immunantwort (Greter et al., 2005).

Die von DCs sezernierten Zytokine sind die Hauptbotenstoffe, die über die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen entscheiden. Die *in vitro* Behandlung von maturen murinen BMDCs und maturen humanen MDDCs mit Laquinimod, reduzierte die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β signifikant. Erwähnenswert ist, dass ein ähnliches Ergebnis bei CD1c⁺ konventionellen DCs aus dem Blut von Laquinimod-behandelten MS-Patienten gefunden wurde. Diese Zytokine sollen für den Gewebeschaden im ZNS während der EAE verantwortlich sein (Centonze et al., 2009; Rossi et al., 2010). IL-1 β ist im Menschen für die Differenzierung von T-Zellen in T_H17-Zellen notwendig (Hebel et al., 2011). In der Maus wirkt es synergistisch mit IL-6 und IL-23 bei der Induktion von T_H17-Immunantworten zusammen (Chung et al., 2009). TNF- α übt neben seinem direkt toxischen Effekt einen entzündungserhaltenden Effekt aus, indem es Immunzellen zum Ort der Entzündung rekrutiert (Skarica et al., 2009). Es darf nicht unerwähnt bleiben, dass das regulatorisch wirkende Zytokin IL-10 in humanen, Laquinimod-behandelten DCs reduziert war. Für das regulatorische Potenzial von IL-10 ist allerdings das Verhältnis von IL-10 zu IL-12 maßgeblich (Saraiva et al., 2009), welches in den hier durchgeführten Experimenten scheinbar keine regulatorische Wirkung nach sich gezogen hat. Den hier dargestellten Ergebnissen entsprechend wurde eine verringerte IL-10 Produktion durch Splenozyten in MOG-immunisierten Mäusen unter Laquinimod-Behandlung beschrieben (Wegner et al., 2010).

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung von T-Zellen durch die Behandlung mit Laquinimod verändert wurde. So wurde eine Reduktion von T_H1-Zellen (definiert als IFN- γ produzierende Zellen) und T_H17-Zellen (definiert als IL-17 produzierende Zellen) nachgewiesen. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Veröffentlichungen (Wegner et al., 2010; Yang et al., 2004; Zou et al., 2002). Auf ähnliche Weise beeinträchtigte Laquinimod auch die Differenzierung von T-Zellen in humanen Kokultorexperimenten. Dabei wurden naive T-Zellen durch allogene, Laquinimod-behandelte MDDC stimuliert, was zu einer verringerten IFN- γ Produktion durch die T-Zellen führte. Daraus kann geschlossen werden, dass die Behandlung von maturen MDDCs mit Laquinimod deren T_H1-polarisierende Fähigkeit beeinträchtigt. Allerdings beruht die stimulatorische Wirkung allogener DCs in diesem experimentellen Layout auf *mismatches* unterschiedlicher humaner Leukozyten-Antigenklassen zwischen den unterschiedlichen Spendern der beiden Zelltypen. Daher musste für die Translation der Antigen-spezifischen Immunantwort von 2D2-T-Zellen in MOG₃₅₋₅₅ immunisierten, Laquinimod-behandelten Mäusen auf das humane Modell ein anderes Experimentdesign gefunden werden. Hierzu wurde ein *MLR assay* gewählt, bei dem antigen-spezifische humane T-Zellen von autologen MDDCs aktiviert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Restimulation von autologen MBP₈₅₋₉₉-spezifischen T-Zellen durch MBP₈₅₋₉₉ gepulste, Laquinimod-behandelte MDDCs zu einer veränderten T-Zellaktivierung mit einer reduzierten IFN- γ und TNF- α Produktion führte. Diese Ergebnisse bestätigen kürzlich veröffentlichte Daten, die von einer Beeinträchtigung der Antigenpräsentation von DCs und Monozyten unter Laquinimod-Behandlung berichten (Schulze-Topphoff et al., 2012; Thone et al., 2012). Als mögliche Erklärung für diese veränderte T-Zelldifferenzierung konnte in den hier durchgeführten Experimenten eine verminderte Genexpression des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 auf maturen, Laquinimod-behandelten DCs nachgewiesen werden. Tatsächlich spielt ICAM-1 eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der immunologischen Synapse beim Kontakt zwischen APC und T-Zelle im Kontakt mit LFA-1, wodurch die Immunantwort verstärkt wird (Grakoui et al., 1999; Monks, Freiberg, Kupfer, Sciaky, & Kupfer, 1998).

Dadurch konnte gezeigt werden, dass Laquinimod die DCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in ihrer Funktion beeinträchtigt. Den hier erhobenen Daten zufolge, scheint Laquinimod dabei den NF- κ B Signaltransduktionsweg zu verändern, was zu veränderten T-Zellantworten führt. Eine vergleichbar starke Verminderung der Polarisierungsfähigkeit humaner MDDC zu einer T_H1-Immunantwort wurde kürzlich für Fingolimod (Muller et al., 2005) und Fumarat

(Ghoreschi et al., 2011) gezeigt. Für Copaxone konnte eine modulierende Wirkung sowohl auf DCs als auch auf Monozyten gezeigt werden (Weber et al., 2007; Weber et al., 2004). Zu Daclizumab, einem humanisierten monoklonalen Antikörper gegen CD25, konnte vor einiger Zeit eine Wirkung auf mature DCs nachgewiesen werden, die möglicherweise die Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen durch die behandelten DCs hemmt (Wuest et al., 2011).

5 Anhang

5.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Quelle	Seite
Abb. 1: Wirkung von Cladribin auf Zellzahl und Zellfunktionen.	aus: (Kraus et al., 2014)	40
Abb. 2: Einfluss von Cladribin auf die Phagozytose.	aus: (Kraus et al., 2014)	41
Abb. 3: Genexpression von Deoxycytidinkinase und 5'-Deoxynucleotidase in murinen und humanen DC.	verändert nach: Kraus et al., 2014	42
Abb. 4: Das Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen wird durch Cladribin verändert.	aus: (Kraus et al., 2014)	44
Abb. 5: Cladribin ändert die T-Zell polarisierende Funktion Dendritischer Zellen.	aus: (Kraus et al., 2014)	46
Abb. 6: Cladribin verändert die Cytokin- und Chemokin-Produktion von humanen und murinen Dendritischen Zellen.	aus: (Kraus et al., 2014)	48
Abb. 7: Laquinimod verringert die Fähigkeit von monozytenstämmigen DC, T-Zellen zur Proliferation anzuregen.	aus: (Jolivel et al., 2013)	50
Abb. 8: Einfluss von Laquinimod auf die Zellzahl nach <i>in vitro</i> -Kultur.	aus: (Jolivel et al., 2013)	52
Abb. 9: Produktion von Cytokinen und Chemokinen durch humane und murine Dendritische Zellen.	verändert aus: (Jolivel et al., 2013)	54
Abb. 10: Laquinimod beeinflusst die Expression von Oberflächenmolekülen auf Dendritische Zellen.	aus: (Jolivel et al., 2013)	56
Abb. 11: Laquinimod beeinflusst die Cytokin- und Chemokinproduktion von DC <i>ex vivo</i> .	verändert nach: (Jolivel et al., 2013)	58
Abb. 12: Laquinimod beeinträchtigt den kanonischen NF-κB Signaltransduktionsweg.	aus: (Jolivel et al., 2013)	60
Abb. 13: Laquinimod beeinträchtigt die Genexpression von IL-1β und den Oberflächenmolekülen IL-1R1, IL-1R2 und ICAM-1 und den nonkanonischen NF-κB Signaltransduktionsweg.	verändert nach: (Jolivel et al., 2013)	61

5.2 Abkürzungen

5-NT	5'-Deoxynucleotidase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BD Biosciences	Becton Dickinson Biosciences
BMDC	<i>Bone marrow-derived Dendritic Cells</i>
bzw.	beziehungsweise
CCL	<i>C-C motif ligand</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CFA	Freundsches Adjuvans
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CSF	Cerebrospinal fluid
DC	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FCS	<i>Foetal calf serum</i>
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor</i>
i.v.	Intravenös
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IKK- β	κ B-Kinase- β -Inhibitor
IKK- γ	κ B-Kinase- γ -Inhibitor
IL	Interleukin
IL-1R1	Interleukin-1 Rezeptor Typ I
IL-1R2	Interleukin-1 Rezeptor Typ II
IMDM	Iscoe's <i>modified</i> Dulbecco's medium

LPS	Lipopolysaccharid
MBP	Myelinbindungsprotein
MDDC	<i>Monocyte-derived Dendritic Cells</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> Haupthistokompatibilitätskomplex
MLR	<i>Mixed leucocyte reaction</i>
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein
MRT	Magnetresonanztomograph
MS	Multiple Sklerose
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NH ₄	Ammonium
NK-Zellen	<i>Natural killer</i> Zellen
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PLP	Proteolipid-Protein
PPIA	Peptidylprolyl-Isomerase A
PTX	Pertussistoxin
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>
ZNS	Zentralnervensystem

5.3 Veröffentlichungen

- Jolivel, V., Luessi, F., Masri, J., **Kraus, S. H.**, Hubo, M., Poisa-Beiro, L., . . . Waisman, A. (2013). Modulation of dendritic cell properties by laquinimod as a mechanism for modulating multiple sclerosis. *Brain*, 136(Pt 4), 1048-1066.
- Kraus, S. H.**, Luessi, F., Trinschek, B., Lerch, S., Hubo, M., Poisa-Beiro, L., . . . Jolivel, V. (2014). Cladribine exerts an immunomodulatory effect on human and murine dendritic cells. *Int Immunopharmacol*, 18(2), 347-357
- Luessi, F., **Kraus, S. H.**, Trinschek, B., Roberg, T., Lerch, S., Hubo, M., Klotz, L., Wiendl, H., Jonuleit, H., Siffrin, V., Jolivel, V., Witsch, E., Zipp, F. (2015). FTY720 (fingolimod) treatment tips the balance towards less immunogenic antigen-presenting cells in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*, 21(14), 1811-22.
- Luessi, F., Jolivel, V., **Kraus, S. H.**, Friedrich, M., Zayoud, M., Klebow, S., Tumani, H., Furlan, R., Kurschus, F., Sorani, E., Hayardeny, L., Waisman, A., Zipp, F. (in preparation). Laquinimod down-regulates the immunogenicity of monocytes in patients with multiple sclerosis.

5.4 Danksagung

Eine für mich persönlich so wichtige Arbeit konnte ich nicht schreiben ohne die Unterstützung vieler, lieber Menschen.

Ich bedanke mich bei meiner Betreuerin für die Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Medizin und die großartige Unterstützung.

Ich danke den beiden Gutachtern für die Korrektur dieser Arbeit und die Betreuung im Fachbereich Biologie.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen, die sich stets viel Zeit genommen haben, meine Fragen geduldig zu beantworten. Ohne ihre Denkanstöße und großartige Unterstützung wäre diese Arbeit nicht das, was sie nun ist.

Ebenso danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe, die mir die Zeit meiner Promotion durch ihre Gespräche und Ratschläge zu einer Zeit gemacht haben, an die ich sehr gerne zurück denke.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Neurologie, die mir durch ihre ständige Hilfsbereitschaft vieles erleichtert haben, möchte ich ebenfalls herzlich danken. Ganz besonders den Technischen Assistentinnen und Assistenten

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Durch ihre uneingeschränkte, moralische und finanzielle Unterstützung ermöglichten sie mir ein unvergessliches Studium und viele schöne Jahre in Mainz. Sie haben mich nicht nur zu jeder Zeit meines Studiums ermuntert, sondern auch immer viel Interesse für meine Arbeit – auch durch das Korrekturlesen dieser Arbeit – gezeigt. Ohne sie wäre mein Studium niemals möglich gewesen.

Schließlich bedanke ich mich von ganzem Herzen bei Angelika, der Frau an meiner Seite, die mich über die gesamte Promotionsdauer durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat. Für ihr liebevolles Verständnis, ihren Zuspruch, ihre Unterstützung und Hilfe möchte ich ihr von Herzen danken. Ohne sie hätte ich manches Mal den Mut verloren und wäre nicht da, wo ich jetzt bin.

5.5 Literaturverzeichnis

- Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*, 8(9), 942-949. doi: 10.1038/ni1496
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J., & Gurney, A. L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 278(3), 1910-1914. doi: 10.1074/jbc.M207577200
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., McNagny, K. M., & Rossi, F. M. (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci*, 14(9), 1142-1149. doi: 10.1038/nn.2887
- Alvermann, S., Hennig, C., Stuve, O., Wiendl, H., & Stangel, M. (2014). Immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis: in search of biomarkers. *JAMA Neurol*, 71(7), 905-912. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.395
- Anguille, S., Willemsen, Y., Lion, E., Smits, E. L., & Berneman, Z. N. (2012). Dendritic cell vaccination in acute myeloid leukemia. *Cytotherapy*, 14(6), 647-656. doi: 10.3109/14653249.2012.693744
- Antel, J., & Bar-Or, A. (2006). Roles of immunoglobulins and B cells in multiple sclerosis: from pathogenesis to treatment. *J Neuroimmunol*, 180(1-2), 3-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.06.032
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., . . . Rajewsky, K. (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med*, 192(3), 393-404.
- Baccini, M., Bachmaier, E. M., Biggeri, A., Boekschoten, M. V., Bouwman, F. G., Brennan, L., . . . Nu, G. O. P. S. T. (2008). The NuGO proof of principle study package: a collaborative research effort of the European Nutrigenomics Organisation. *Genes Nutr*, 3(3-4), 147-151. doi: 10.1007/s12263-008-0102-5
- Bagnato, F., & Pirko, I. (2011). Novel agents and emerging treatment strategies in multiple sclerosis. What role for cladribine? *Clin Med Insights: Therapeutics*, 3, 425-439.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252. doi: 10.1038/32588
- Bar-Or, A., Calabresi, P. A., Arnold, D., Markowitz, C., Shafer, S., Kasper, L. H., . . . Smith, C. H. (2008). Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. *Ann Neurol*, 63(3), 395-400. doi: 10.1002/ana.21363
- Barbieri, D., Abbracchio, M. P., Salvioli, S., Monti, D., Cossarizza, A., Ceruti, S., . . . Franceschi, C. (1998). Apoptosis by 2-chloro-2'-deoxy-adenosine and 2-chloro-adenosine in human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochem Int*, 32(5-6), 493-504.
- Barry, M., & Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*, 2(6), 401-409. doi: 10.1038/nri819
- Bartosik-Psujek, H., Belniak, E., Mitosek-Szewczyk, K., Dobosz, B., & Stelmasiak, Z. (2004). Interleukin-8 and RANTES levels in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RR-MS) treated with cladribine. *Acta Neurol Scand*, 109(6), 390-392. doi: 10.1111/j.1600-0404.2004.00259.x
- Berman, J. W., Guida, M. P., Warren, J., Amat, J., & Brosnan, C. F. (1996). Localization of monocyte chemoattractant peptide-1 expression in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis and trauma in the rat. *J Immunol*, 156(8), 3017-3023.
- Bernard, A., Coitot, S., Bremont, A., & Bernard, G. (2005). T and B cell cooperation: a dance of life and death. *Transplantation*, 79(3 Suppl), S8-S11.
- Beutler, E. (1992). Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine). *Lancet*, 340(8825), 952-956.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., & Wiley, D. C. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329(6139), 512-518. doi: 10.1038/329512a0
- Bontemps, F., Meier, C., Delacauw, A., Balzarini, J., Galmarini, C., & van den Neste, E. (2006). Study of the efficacy of a pronucleotide of 2-chloro-2'-deoxyadenosine in deoxycytidine kinase-

- deficient lymphoma cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 25(9-11), 997-1000. doi: 10.1080/15257770600889444
- Bruck, W., Pfortner, R., Pham, T., Zhang, J., Hayardeny, L., Piryatinsky, V., . . . Wegner, C. (2012). Reduced astrocytic NF-kappaB activation by laquinimod protects from cuprizone-induced demyelination. *Acta Neuropathol*, 124(3), 411-424. doi: 10.1007/s00401-012-1009-1
- Bruck, W., & Wegner, C. (2011). Insight into the mechanism of laquinimod action. *J Neurol Sci*, 306(1-2), 173-179. doi: 10.1016/j.jns.2011.02.019
- Brunmark, C., Runstrom, A., Ohlsson, L., Sparre, B., Brodin, T., Astrom, M., & Hedlund, G. (2002). The new orally active immunoregulator laquinimod (ABR-215062) effectively inhibits development and relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 130(1-2), 163-172.
- Castejon, R., Vargas, J. A., Briz, M., Berrocal, E., Romero, Y., Gea-Banacloche, J. C., . . . Durantez, A. (1997). Induction of apoptosis by 2-chlorodeoxyadenosine in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 11(8), 1253-1257.
- Centonze, D., Muzio, L., Rossi, S., Cavasinni, F., De Chiara, V., Bergami, A., . . . Martino, G. (2009). Inflammation triggers synaptic alteration and degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci*, 29(11), 3442-3452. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5804-08.2009
- Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R., & Lascrain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, 6(1), 15-25. doi: 10.1038/cmi.2009.3
- Chen, M. L., Tsai, T. C., Wang, L. K., Lin, Y. Y., Tsai, Y. M., Lee, M. C., & Tsai, F. M. (2012). Risperidone modulates the cytokine and chemokine release of dendritic cells and induces TNF-alpha-directed cell apoptosis in neutrophils. *Int Immunopharmacol*, 12(1), 197-204. doi: 10.1016/j.intimp.2011.11.011
- Chung, Y., Chang, S. H., Martinez, G. J., Yang, X. O., Nurieva, R., Kang, H. S., . . . Dong, C. (2009). Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, 30(4), 576-587. doi: 10.1016/j.immuni.2009.02.007
- Coles, A. J., Fox, E., Vladoic, A., Gazda, S. K., Brinar, V., Selmaj, K. W., . . . Compston, D. A. (2012). Alemtuzumab more effective than interferon beta-1a at 5-year follow-up of CAMMS223 clinical trial. *Neurology*, 78(14), 1069-1078. doi: 10.1212/WNL.0b013e31824e8ee7
- Comi, G., Jeffery, D., Kappos, L., Montalban, X., Boyko, A., Rocca, M. A., . . . Group, A. S. (2012). Placebo-controlled trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 366(11), 1000-1009. doi: 10.1056/NEJMoa1104318
- Comi, G., Pulizzi, A., Rovaris, M., Abramsky, O., Arbizu, T., Boiko, A., . . . Group, L. A. Q. S. (2008). Effect of laquinimod on MRI-monitored disease activity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet*, 371(9630), 2085-2092. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60918-6
- Davis, J. C., Jr., Austin, H., 3rd, Boumpas, D., Fleisher, T. A., Yarboro, C., Larson, A., . . . Scott, D. (1998). A pilot study of 2-chloro-2'-deoxyadenosine in the treatment of systemic lupus erythematosus-associated glomerulonephritis. *Arthritis Rheum*, 41(2), 335-343. doi: 10.1002/1529-0131(199802)41:2<335::AID-ART18>3.0.CO;2-O
- Dhaunchak, A. S., Becker, C., Schulman, H., De Faria, O., Jr., Rajasekharan, S., Banwell, B., . . . Canadian Pediatric Demyelinating Disease, G. (2012). Implication of perturbed axoglial apparatus in early pediatric multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 71(5), 601-613. doi: 10.1002/ana.22693
- Di Rosa, F., Serafini, B., Scognamiglio, P., Di Virgilio, A., Finocchi, L., Aloisi, F., & Barnaba, V. (2000). Short-lived immunization site inflammation in self-limited active experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol*, 12(5), 711-719.
- Dinarelli, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117(14), 3720-3732. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417
- Dunkelberger, J. R., & Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 20(1), 34-50. doi: 10.1038/cr.2009.139
- Dutertre, C. A., Wang, L. F., & Ginhoux, F. (2014). Aligning bona fide dendritic cell populations across species. *Cell Immunol*. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.08.006

- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., . . . Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 165(11), 6037-6046.
- Eiz-Vesper, B., Horn, P. A., Daubert, C., Khattab, B., & Blasczyk, R. (2006). Tetanus toxoid provides efficient T-cell help for the induction of HA-1(H) cytotoxic T cells. *Transfusion*, 46(7), 1210-1220. doi: 10.1111/j.1537-2995.2006.00872.x
- El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., . . . Rostami, A. (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol*, 12(6), 568-575. doi: 10.1038/ni.2031
- Engelhardt, B., & Ransohoff, R. M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol*, 26(9), 485-495. doi: 10.1016/j.it.2005.07.004
- Ghoreschi, K., Bruck, J., Kellerer, C., Deng, C., Peng, H., Rothfuss, O., . . . Rocken, M. (2011). Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J Exp Med*, 208(11), 2291-2303. doi: 10.1084/jem.20100977
- Giovannoni, G., Comi, G., Cook, S., Rammohan, K., Rieckmann, P., Soelberg Sorensen, P., . . . Group, C. S. (2010). A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 362(5), 416-426. doi: 10.1056/NEJMoa0902533
- Giovannoni, G., Cook, S., Rammohan, K., Rieckmann, P., Sorensen, P. S., Vermersch, P., . . . group, C. s. (2011). Sustained disease-activity-free status in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with cladribine tablets in the CLARITY study: a post-hoc and subgroup analysis. *Lancet Neurol*, 10(4), 329-337. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70023-0
- Girardi, K., Paviglianiti, A., Cirillo, M., Bianchi, A., Gherardi, G., Annibali, O., . . . Avvisati, G. (2012). Tuberculous meningoencephalitis in a patient with hairy cell leukemia in complete remission. *J Clin Exp Hematop*, 52(1), 31-34.
- Glabinski, A. R., Tuohy, V. K., & Ransohoff, R. M. (1998). Expression of chemokines RANTES, MIP-1 α and GRO- α correlates with inflammation in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation*, 5(3-4), 166-171.
- Gold, R., Linington, C., & Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, 129(Pt 8), 1953-1971. doi: 10.1093/brain/awl075
- Gonzalo, J. A., Delaney, T., Corcoran, J., Goodearl, A., Gutierrez-Ramos, J. C., & Coyle, A. J. (2001). Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol*, 166(1), 1-5.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., & Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285(5425), 221-227.
- Gran, B., Zhang, G. X., Yu, S., Li, J., Chen, X. H., Ventura, E. S., . . . Rostami, A. (2002). IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol*, 169(12), 7104-7110.
- Granelli-Piperno, A., Pope, M., Inaba, K., & Steinman, R. M. (1995). Coexpression of NF-kappa B/Rel and Sp1 transcription factors in human immunodeficiency virus 1-induced, dendritic cell-T-cell syncytia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(24), 10944-10948.
- Grauer, O., Wohlleben, G., Seubert, S., Weishaupt, A., Kampgen, E., & Gold, R. (2002). Analysis of maturation states of rat bone marrow-derived dendritic cells using an improved culture technique. *Histochem Cell Biol*, 117(4), 351-362. doi: 10.1007/s00418-002-0384-4
- Greter, M., Heppner, F. L., Lemos, M. P., Odermatt, B. M., Goebels, N., Laufer, T., . . . Becher, B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med*, 11(3), 328-334. doi: 10.1038/nm1197
- Grewal, I. S., & Flavell, R. A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*, 16, 111-135. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.111

- Groettrup, M., Soza, A., Kuckelkorn, U., & Kloetzel, P. M. (1996). Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol Today*, 17(9), 429-435.
- Grunberger, G., Bailey, T. S., Cohen, A. J., Flood, T. M., Handelsman, Y., Hellman, R., . . . Force, A. I. P. M. T. (2010). Statement by the American Association of Clinical Endocrinologists Consensus Panel on insulin pump management. *Endocr Pract*, 16(5), 746-762. doi: 10.4158/EP.16.5.746
- Guilliams, M., Henri, S., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M., & Malissen, B. (2010). From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur J Immunol*, 40(8), 2089-2094. doi: 10.1002/eji.201040498
- Gurevich, M., Gritzman, T., Orbach, R., Tuller, T., Feldman, A., & Achiron, A. (2010). Laquinimod suppress antigen presentation in relapsing-remitting multiple sclerosis: in-vitro high-throughput gene expression study. *J Neuroimmunol*, 221(1-2), 87-94. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.02.010
- Haak, S., Croxford, A. L., Kreyborg, K., Heppner, F. L., Pouly, S., Becher, B., & Waisman, A. (2009). IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest*, 119(1), 61-69. doi: 10.1172/JCI35997
- Hauser, S. L., Waubant, E., Arnold, D. L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R. J., . . . Group, H. T. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 358(7), 676-688. doi: 10.1056/NEJMoa0706383
- Hebel, K., Rudolph, M., Kosak, B., Chang, H. D., Butzmann, J., & Brunner-Weinzierl, M. C. (2011). IL-1beta and TGF-beta act antagonistically in induction and differentially in propagation of human proinflammatory precursor CD4+ T cells. *J Immunol*, 187(11), 5627-5635. doi: 10.4049/jimmunol.1003998
- Held, K., Beltran, E., Moser, M., Hohnfeld, R., & Dornmair, K. (2015). T-cell receptor repertoire of human peripheral CD161(hi)TRAV1-2(+) MAIT cells revealed by next generation sequencing and single cell analysis. *Hum Immunol*, 76(9), 607-614. doi: 10.1016/j.humimm.2015.09.002
- Held, K., Bhonsle-Deeng, L., Siewert, K., Sato, W., Beltran, E., Schmidt, S., . . . Dornmair, K. (2015). alphabeta T-cell receptors from multiple sclerosis brain lesions show MAIT cell-related features. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2(4), e107. doi: 10.1212/NXI.0000000000000107
- Henkart, P. A. (1985). Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 3, 31-58. doi: 10.1146/annurev.iy.03.040185.000335
- Henri, S., Guilliams, M., Poulin, L. F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Dalod, M., & Malissen, B. (2010). Disentangling the complexity of the skin dendritic cell network. *Immunol Cell Biol*, 88(4), 366-375. doi: 10.1038/icb.2010.34
- Herges, K. (2011). *The development of alternative therapeutic strategies for the treatment of Multiple Sclerosis utilizing Glatiramer acetate*. (Dr. med. MD thesis), Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Herz, J., Zipp, F., & Siffrin, V. (2010). Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. *Exp Neurol*, 225(1), 9-17. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.11.019
- Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., & O'Keeffe, M. (2001). Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol*, 166(9), 5448-5455.
- Hofer, S., Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Francolini, M., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Differential activation of NF-kappa B subunits in dendritic cells in response to Gram-negative bacteria and to lipopolysaccharide. *Microbes Infect*, 3(4), 259-265.
- Hofer, T., Nathansen, H., Lohning, M., Radbruch, A., & Heinrich, R. (2002). GATA-3 transcriptional imprinting in Th2 lymphocytes: a mathematical model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(14), 9364-9368. doi: 10.1073/pnas.142284699
- Hofmann, N., Lachnit, N., Streppel, M., Witter, B., Neiss, W. F., Guntinas-Lichius, O., & Angelov, D. N. (2002). Increased expression of ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, and MIP-1 alpha by spinal perivascular macrophages during experimental allergic encephalomyelitis in rats. *BMC Immunol*, 3, 11.

- Ignatowicz, L., Kappler, J., & Marrack, P. (1996). The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell*, 84(4), 521-529.
- Ivanov, I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelletier, A., Lafaille, J. J., . . . Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121-1133. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.035
- Janeway, C. A., Jr., Sharrow, S. O., & Simpson, E. (1975). T-cell populations with different functions. *Nature*, 253(5492), 544-546.
- Janiec, K., Wajgt, A., & Kondera-Anasz, Z. (2001). Effect of immunosuppressive cladribine treatment on serum leucocytes system in two-year clinical trial in patients with chronic progressive multiple sclerosis. *Med Sci Monit*, 7(1), 93-98.
- Jolivel, V., Luessi, F., Masri, J., Kraus, S. H., Hubo, M., Poisa-Beiro, L., . . . Waisman, A. (2013). Modulation of dendritic cell properties by laquinimod as a mechanism for modulating multiple sclerosis. *Brain*, 136(Pt 4), 1048-1066. doi: 10.1093/brain/awt023
- Jonsson, S., Andersson, G., Fex, T., Fristedt, T., Hedlund, G., Jansson, K., . . . Bjork, A. (2004). Synthesis and biological evaluation of new 1,2-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-3-quinolinecarboxamides for treatment of autoimmune disorders: structure-activity relationship. *J Med Chem*, 47(8), 2075-2088. doi: 10.1021/jm031044w
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., & Enk, A. H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*, 192(9), 1213-1222.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R. M., & Hengartner, H. (1996). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol*, 14, 207-232. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.207
- Kanter, J. L., Narayana, S., Ho, P. P., Catz, I., Warren, K. G., Sobel, R. A., . . . Robinson, W. H. (2006). Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat Med*, 12(1), 138-143. doi: 10.1038/nm1344
- Karpus, W. J., Lukacs, N. W., McRae, B. L., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., & Miller, S. D. (1995). An important role for the chemokine macrophage inflammatory protein-1 α in the pathogenesis of the T cell-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 155(10), 5003-5010.
- Keir, M. E., & Sharpe, A. H. (2005). The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev*, 204, 128-143. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00242.x
- Klein, S. A., Dobmeyer, J. M., Dobmeyer, T. S., Pape, M., Ottmann, O. G., Helm, E. B., . . . Rossol, R. (1997). Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *AIDS*, 11(9), 1111-1118.
- Klopfer, A., Hasenjager, A., Belka, C., Schulze-Osthoff, K., Dorken, B., & Daniel, P. T. (2004). Adenine deoxynucleotides fludarabine and cladribine induce apoptosis in a CD95/Fas receptor, FADD and caspase-8-independent manner by activation of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*, 23(58), 9408-9418. doi: 10.1038/sj.onc.1207975
- Kopadze, T., Dobert, M., Leussink, V. I., Dehmel, T., & Kieseier, B. C. (2009). Cladribine impedes in vitro migration of mononuclear cells: a possible implication for treating multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, 16(3), 409-412. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02433.x
- Kozioł, J. A., Lucero, A., Sipe, J. C., Romine, J. S., & Beutler, E. (1999). Responsiveness of the Scripps neurologic rating scale during a multiple sclerosis clinical trial. *Can J Neurol Sci*, 26(4), 283-289.
- Kraus, S. H., Luessi, F., Trinschek, B., Lerch, S., Hubo, M., Poisa-Beiro, L., . . . Jolivel, V. (2014). Cladribine exerts an immunomodulatory effect on human and murine dendritic cells. *Int Immunopharmacol*, 18(2), 347-357. doi: 10.1016/j.intimp.2013.11.027
- Kroenke, M. A., Carlson, T. J., Andjelkovic, A. V., & Segal, B. M. (2008). IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med*, 205(7), 1535-1541. doi: 10.1084/jem.20080159

- Krystyna, M. S., Jacek, T., Sebastian, R., Ewa, B., Halina, B. P., Zbigniew, S., & Jacek, R. (2009). Changes in circulating dendritic cells and B-cells in patients with multiple sclerosis relapse during corticosteroid therapy. *J Neuroimmunol*, 207(1-2), 107-110. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.11.010
- Kubasak, M. D., Hedlund, E., Roy, R. R., Carpenter, E. M., Edgerton, V. R., & Phelps, P. E. (2005). L1 CAM expression is increased surrounding the lesion site in rats with complete spinal cord transection as neonates. *Exp Neurol*, 194(2), 363-375. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.02.013
- Kuchroo, V. K., Das, M. P., Brown, J. A., Ranger, A. M., Zamvil, S. S., Sobel, R. A., . . . Glimcher, L. H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*, 80(5), 707-718.
- Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., & Bruck, W. (2002). Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*, 125(Pt 10), 2202-2212.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 1(4), 311-316. doi: 10.1038/79758
- Lanzavecchia, A., Ferrarini, M., & Celada, F. (1982). Human T cell lines with antigen specificity and helper activity. *Eur J Immunol*, 12(6), 468-474. doi: 10.1002/eji.1830120604
- Laugel, B., Borlat, F., Galibert, L., Vicari, A., Weissert, R., Chvatchko, Y., & Bruniquel, D. (2011). Cladribine inhibits cytokine secretion by T cells independently of deoxycytidine kinase activity. *J Neuroimmunol*, 240-241, 52-57. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.09.010
- LeBien, T. W. (2000). Fates of human B-cell precursors. *Blood*, 96(1), 9-23.
- Li, X. C., & Raghavan, M. (2010). Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens. *Curr Opin Organ Transplant*, 15(4), 499-504. doi: 10.1097/MOT.0b013e32833bfb33
- Li, Y., Chu, N., Hu, A., Gran, B., Rostami, A., & Zhang, G. X. (2007). Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain*, 130(Pt 2), 490-501. doi: 10.1093/brain/awl273
- Liliemark, J., & Juliusson, G. (1991). On the pharmacokinetics of 2-chloro-2'-deoxyadenosine in humans. *Cancer Res*, 51(20), 5570-5572.
- Liliemark, J., & Peterson, C. (2005). Purine analogs and antifolates. In J. H. M. Schellers, H. L. McLeod & D. R. Newell (Eds.), *Cancer Clinical Pharmacology* (pp. 63-83). Oxford: Oxford University Press.
- Liu, D. F., Ferguson, K., Cooper, G. S., Grady, W. M., & Willis, J. (1999). p27 cell-cycle inhibitor is inversely correlated with lymph node metastases in right-sided colon cancer. *J Clin Lab Anal*, 13(6), 291-295.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lotfi, K., Juliusson, G., & Albertioni, F. (2003). Pharmacological basis for cladribine resistance. *Leuk Lymphoma*, 44(10), 1705-1712. doi: 10.1080/1042819031000099698
- Lovett-Racke, A. E., Yang, Y., & Racke, M. K. (2011). Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim Biophys Acta*, 1812(2), 246-251. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.05.012
- Luchtman, D. W., Ellwardt, E., Larochelle, C., & Zipp, F. (2014). IL-17 and related cytokines involved in the pathology and immunotherapy of multiple sclerosis: Current and future developments. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25(4), 403-413. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.013
- Lutz, M. B., & Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*, 23(9), 445-449.
- Manczak, M., Jiang, S., Orzechowska, B., & Adamus, G. (2002). Crucial role of CCL3/MIP-1alpha in the recurrence of autoimmune anterior uveitis induced with myelin basic protein in Lewis rats. *J Autoimmun*, 18(4), 259-270.
- Matusevicius, D., Kivisakk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S., & Link, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 5(2), 101-104.

- Matzinger, P. (2007). Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol*, 8(1), 11-13. doi: 10.1038/ni0107-11
- McClain, K. L. (2005). Drug therapy for the treatment of Langerhans cell histiocytosis. *Expert Opin Pharmacother*, 6(14), 2435-2441. doi: 10.1517/14656566.6.14.2435
- McColl, S. R. (2002). Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol*, 80(5), 489-496. doi: 10.1046/j.1440-1711.2002.01113.x
- McManus, C., Berman, J. W., Brett, F. M., Staunton, H., Farrell, M., & Brosnan, C. F. (1998). MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol*, 86(1), 20-29.
- McRae, B. L., Kennedy, M. K., Tan, L. J., Dal Canto, M. C., Picha, K. S., & Miller, S. D. (1992). Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein. *J Neuroimmunol*, 38(3), 229-240.
- Medana, I., Martinic, M. A., Wekerle, H., & Neumann, H. (2001). Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol*, 159(3), 809-815. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61755-5
- Mitchison, N. A. (2004). T-cell-B-cell cooperation. *Nat Rev Immunol*, 4(4), 308-312. doi: 10.1038/nri1334
- Mittag, D., Proietto, A. I., Loudovaris, T., Mannering, S. I., Vremec, D., Shortman, K., . . . Harrison, L. C. (2011). Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J Immunol*, 186(11), 6207-6217. doi: 10.4049/jimmunol.1002632
- Miyagishi, R., Kikuchi, S., Fukazawa, T., & Tashiro, K. (1995). Macrophage inflammatory protein-1 alpha in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases. *J Neurol Sci*, 129(2), 223-227.
- Momburg, F., Neefjes, J. J., & Hammerling, G. J. (1994). Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters. *Curr Opin Immunol*, 6(1), 32-37.
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., & Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 395(6697), 82-86. doi: 10.1038/25764
- Moron, G., Rueda, P., Casal, I., & Leclerc, C. (2002). CD8alpha- CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules. *J Exp Med*, 195(10), 1233-1245.
- Muller, H., Hofer, S., Kaneider, N., Neuwirt, H., Mosheimer, B., Mayer, G., . . . Tiefenthaler, M. (2005). The immunomodulator FTY720 interferes with effector functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*, 35(2), 533-545. doi: 10.1002/eji.200425556
- Nagata, S. (1996). Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol*, 406, 119-124.
- Nagata, S., & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, 267(5203), 1449-1456.
- Neumann, M., Fries, H., Scheicher, C., Keikavoussi, P., Kolb-Maurer, A., Bocker, E., . . . Kampgen, E. (2000). Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood*, 95(1), 277-285.
- Niezgoda, A., Losy, J., & Mehta, P. D. (2001). Effect of cladribine treatment on beta-2 microglobulin and soluble intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in patients with multiple sclerosis. *Folia Morphol (Warsz)*, 60(3), 225-228.
- Noseworthy, J. H., Wolinsky, J. S., Lublin, F. D., Whitaker, J. N., Linde, A., Gjorstrup, P., & Sullivan, H. C. (2000). Linomide in relapsing and secondary progressive MS: part I: trial design and clinical results. North American Linomide Investigators. *Neurology*, 54(9), 1726-1733.
- Oppenheim, J. J., Zachariae, C. O., Mukaida, N., & Matsushima, K. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol*, 9, 617-648. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.003153
- Orsini, G., Legitimo, A., Failli, A., Massei, F., Biver, P., & Consolini, R. (2012). Enumeration of human peripheral blood dendritic cells throughout the life. *Int Immunol*, 24(6), 347-356. doi: 10.1093/intimm/dxs006

- Panitch, H. S., Hirsch, R. L., Schindler, J., & Johnson, K. P. (1987). Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology*, 37(7), 1097-1102.
- Papenfuss, T. L., Powell, N. D., McClain, M. A., Bedarf, A., Singh, A., Gienapp, I. E., . . . Whitacre, C. C. (2011). Estriol generates tolerogenic dendritic cells in vivo that protect against autoimmunity. *J Immunol*, 186(6), 3346-3355. doi: 10.4049/jimmunol.1001322
- Pasteur, L., & Illo, J. (1996). Pasteur and rabies: an interview of 1882. *Med Hist*, 40(3), 373-377.
- Paterka, M., Siffrin, V., Voss, J. O., Werr, J., Hoppmann, N., Gollan, R., . . . Zipp, F. (2016). Gatekeeper role of brain antigen-presenting CD11c+ cells in neuroinflammation. *EMBO J*, 35(1), 89-101. doi: 10.15252/embj.201591488
- Petermann, F., & Korn, T. (2011). Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS Lett*, 585(23), 3747-3757. doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.064
- Pierre, P., & Mellman, I. (1998). Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell*, 93(7), 1135-1145.
- Podack, E. R., Lowrey, D. M., Lichtenheld, M., Olsen, K. J., Aebischer, T., Binder, D., . . . Hengartner, H. (1988). Structure, function and expression of murine and human perforin 1 (P1). *Immunol Rev*, 103, 203-211.
- Polman, C., Barkhof, F., Sandberg-Wollheim, M., Linde, A., Nordle, O., Nederman, T., & Laquinimod in Relapsing, M. S. S. G. (2005). Treatment with laquinimod reduces development of active MRI lesions in relapsing MS. *Neurology*, 64(6), 987-991. doi: 10.1212/01.WNL.0000154520.48391.69
- Prodinger, C., Bunse, J., Kruger, M., Schiefenhover, F., Brandt, C., Laman, J. D., . . . Bechmann, I. (2011). CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol*, 121(4), 445-458. doi: 10.1007/s00401-010-0774-y
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R., & Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med*, 188(11), 2175-2180.
- Rivers, T. M., Sprunt, D. H., & Berry, G. P. (1933). Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med*, 58(1), 39-53.
- Robbins, S. H., Walzer, T., Dembele, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., . . . Dalod, M. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol*, 9(1), R17. doi: 10.1186/gb-2008-9-1-r17
- Rocha, N., & Neefjes, J. (2008). MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *EMBO J*, 27(1), 1-5. doi: 10.1038/sj.emboj.7601945
- Roitt, I. M., Greaves, M. F., Torrigiani, G., Brostoff, J., & Playfair, J. H. (1969). The cellular basis of immunological responses. A synthesis of some current views. *Lancet*, 2(7616), 367-371.
- Rossi, S., De Chiara, V., Furlan, R., Musella, A., Cavasinni, F., Muzio, L., . . . Centonze, D. (2010). Abnormal activity of the Na/Ca exchanger enhances glutamate transmission in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*, 24(8), 1379-1385. doi: 10.1016/j.bbi.2010.07.241
- Rotzschke, O., Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., . . . Rammensee, H. G. (1990). Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature*, 348(6298), 252-254. doi: 10.1038/348252a0
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., & Wilson, I. A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol*, 24, 419-466. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115658
- Runstrom, A., Leanderson, T., Ohlsson, L., & Axelsson, B. (2006). Inhibition of the development of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis by laquinimod (ABR-215062) in IFN-beta k.o. and wild type mice. *J Neuroimmunol*, 173(1-2), 69-78. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.11.023
- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., . . . Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function.

- Eur J Immunol*, 29(5), 1617-1625. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-3
- Samoilova, E. B., Horton, J. L., & Chen, Y. (1998). Experimental autoimmune encephalomyelitis in intercellular adhesion molecule-1-deficient mice. *Cell Immunol*, 190(1), 83-89. doi: 10.1006/cimm.1998.1395
- Saraiva, M., Christensen, J. R., Veldhoen, M., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & O'Garra, A. (2009). Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity*, 31(2), 209-219. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.012
- Schirmer, M., Mur, E., Pfeiffer, K. P., Thaler, J., & Konwalinka, G. (1997). The safety profile of low-dose cladribine in refractory rheumatoid arthritis. A pilot trial. *Scand J Rheumatol*, 26(5), 376-379.
- Schneider-Hohendorf, T., Rossaint, J., Mohan, H., Boning, D., Breuer, J., Kuhlmann, T., . . . Wiendl, H. (2014). VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. *J Exp Med*, 211(9), 1833-1846. doi: 10.1084/jem.20140540
- Schulze-Topphoff, U., Shetty, A., Varrin-Doyer, M., Molnarfi, N., Sagan, S. A., Sobel, R. A., . . . Zamvil, S. S. (2012). Laquinimod, a quinoline-3-carboxamide, induces type II myeloid cells that modulate central nervous system autoimmunity. *PLoS One*, 7(3), e33797. doi: 10.1371/journal.pone.0033797
- Schwab, N., Zozulya, A. L., Kieseier, B. C., Toyka, K. V., & Wiendl, H. (2010). An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J Immunol*, 184(9), 5368-5374. doi: 10.4049/jimmunol.0903662
- Seder, R. A., Gazzinelli, R., Sher, A., & Paul, W. E. (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(21), 10188-10192.
- Seto, S., Carrera, C. J., Kubota, M., Wasson, D. B., & Carson, D. A. (1985). Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *J Clin Invest*, 75(2), 377-383. doi: 10.1172/JCI111710
- Shortman, K., & Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*, 2(3), 151-161. doi: 10.1038/nri746
- Sicotte, N. L., Liva, S. M., Klutch, R., Pfeiffer, P., Bouvier, S., Odesa, S., . . . Voskuhl, R. R. (2002). Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann Neurol*, 52(4), 421-428. doi: 10.1002/ana.10301
- Simpson, J. E., Newcombe, J., Cuzner, M. L., & Woodroffe, M. N. (1998). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol*, 84(2), 238-249.
- Singh, V., Chittappen, K. P., Gudi, V., Benardais, K., Voss, E. V., & Stangel, M. (2013). 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine) induces apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. doi: 10.1111/cei.12109
- Singh, V., Prajeeth, C. K., Gudi, V., Benardais, K., Voss, E. V., & Stangel, M. (2013). 2-Chlorodeoxyadenosine (cladribine) induces apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 173(2), 288-297. doi: 10.1111/cei.12109
- Singh, V., Voss, E. V., Benardais, K., & Stangel, M. (2012). Effects of 2-Chlorodeoxyadenosine (Cladribine) on Primary Rat Microglia. *J Neuroimmune Pharmacol*. doi: 10.1007/s11481-012-9387-7
- Sipe, J. C. (2005). Cladribine for multiple sclerosis: review and current status. *Expert Rev Neurother*, 5(6), 721-727. doi: 10.1586/14737175.5.6.721
- Sivina, M., Hartmann, E., Kipps, T. J., Rassenti, L., Krupnik, D., Lerner, S., . . . Burger, J. A. (2011). CCL3 (MIP-1alpha) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 117(5), 1662-1669. doi: 10.1182/blood-2010-09-307249
- Skarica, M., Wang, T., McCadden, E., Kardian, D., Calabresi, P. A., Small, D., & Whartenby, K. A. (2009). Signal transduction inhibition of APCs diminishes th17 and Th1 responses in experimental

- autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 182(7), 4192-4199. doi: 10.4049/jimmunol.0803631
- Skold, M., & Behar, S. M. (2005). The role of group 1 and group 2 CD1-restricted T cells in microbial immunity. *Microbes Infect*, 7(3), 544-551. doi: 10.1016/j.micinf.2004.12.012
- Sorensen, T. L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V. A., . . . Ransohoff, R. M. (1999). Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*, 103(6), 807-815. doi: 10.1172/JCI5150
- Srivastava, R., Aslam, M., Kalluri, S. R., Schirmer, L., Buck, D., Tackenberg, B., . . . Hemmer, B. (2012). Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 367(2), 115-123. doi: 10.1056/NEJMoa1110740
- Steinman, L. (2001). Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol*, 2(9), 762-764. doi: 10.1038/ni0901-762
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, 13(2), 139-145. doi: 10.1038/nm1551
- Steinman, L. (2008). A rush to judgment on Th17. *J Exp Med*, 205(7), 1517-1522. doi: 10.1084/jem.20072066
- Stenstrom, M., Anderson, P., Eroukhmanoff, L., Leanderson, T., & Ivars, F. (2010). Selective depletion of splenic CD4 dendritic cells in mice treated with immunomodulatory quinoline-3-carboxamide ABR-215757. *Int Immunopharmacol*, 10(8), 837-842. doi: 10.1016/j.intimp.2010.04.011
- Stoop, J. N., Harry, R. A., von Delwig, A., Isaacs, J. D., Robinson, J. H., & Hilkens, C. M. (2010). Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. *Arthritis Rheum*, 62(12), 3656-3665. doi: 10.1002/art.27756
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), 655-669.
- Tas, S. W., de Jong, E. C., Hajji, N., May, M. J., Ghosh, S., Vervoordeldonk, M. J., & Tak, P. P. (2005). Selective inhibition of NF-kappaB in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and polarization. *Eur J Immunol*, 35(4), 1164-1174. doi: 10.1002/eji.200425956
- Thone, J., Ellrichmann, G., Seubert, S., Peruga, I., Lee, D. H., Conrad, R., . . . Gold, R. (2012). Modulation of autoimmune demyelination by laquinimod via induction of brain-derived neurotrophic factor. *Am J Pathol*, 180(1), 267-274. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.037
- Tibbling, G., Link, H., & Ohman, S. (1977). Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest*, 37(5), 385-390. doi: 10.1080/00365517709091496
- Traugott, U., Reinherz, E. L., & Raine, C. S. (1983). Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. *Science*, 219(4582), 308-310.
- Trinchieri, G. (1998). Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol*, 70, 83-243.
- Turner, M. L., Schnorfeil, F. M., & Bocker, T. (2011). MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function. *J Immunol*, 187(8), 3911-3917. doi: 10.4049/jimmunol.1101137
- Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M., & Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*, 172(1), 146-155. doi: 10.2353/ajpath.2008.070690
- Vaknin-Dembinsky, A., Balashov, K., & Weiner, H. L. (2006). IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol*, 176(12), 7768-7774.
- Vambutas, A., DeVoti, J., Goldofsky, E., Gordon, M., Lesser, M., & Bonagura, V. (2009). Alternate splicing of interleukin-1 receptor type II (IL1R2) in vitro correlates with clinical glucocorticoid responsiveness in patients with AIED. *PLoS One*, 4(4), e5293. doi: 10.1371/journal.pone.0005293

- Van den Neste, E., Cardoen, S., Offner, F., & Bontemps, F. (2005). Old and new insights into the mechanisms of action of two nucleoside analogs active in lymphoid malignancies: fludarabine and cladribine (review). *Int J Oncol*, 27(4), 1113-1124.
- van der Merwe, P. A., & Davis, S. J. (2003). Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol*, 21, 659-684. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141036
- Vascotto, F., Le Roux, D., Lankar, D., Faure-Andre, G., Vargas, P., Guernonprez, P., & Lennon-Dumenil, A. M. (2007). Antigen presentation by B lymphocytes: how receptor signaling directs membrane trafficking. *Curr Opin Immunol*, 19(1), 93-98. doi: 10.1016/j.coi.2006.11.011
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), 179-189. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.001
- von Boehmer, H., Kisielow, P., Kishi, H., Scott, B., Borgulya, P., & Teh, H. S. (1989). The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the alpha beta receptor for antigen. *Immunol Rev*, 109, 143-151.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., & Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol*, 164(6), 2978-2986.
- Wan, H., & Dupasquier, M. (2005). Dendritic cells in vivo and in vitro. *Cell Mol Immunol*, 2(1), 28-35.
- Warner, N. L., & Szenberg, A. (1963). Immunological Reactivity of Bursaless Chickens in Graft Versus Host Reactions. *Nature*, 199, 43-44.
- Weber, M. S., Prod'homme, T., Youssef, S., Dunn, S. E., Rundle, C. D., Lee, L., . . . Zamvil, S. S. (2007). Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat Med*, 13(8), 935-943. doi: 10.1038/nm1620
- Weber, M. S., Starck, M., Wagenpfeil, S., Meinl, E., Hohlfeld, R., & Farina, C. (2004). Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. *Brain*, 127(Pt 6), 1370-1378. doi: 10.1093/brain/awh163
- Wegner, C., Stadelmann, C., Pfortner, R., Raymond, E., Feigelson, S., Alon, R., . . . Bruck, W. (2010). Laquinimod interferes with migratory capacity of T cells and reduces IL-17 levels, inflammatory demyelination and acute axonal damage in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 227(1-2), 133-143. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.07.009
- Weitzman, S., Wayne, A. S., Arcenci, R., Lipton, J. M., & Whitlock, J. A. (1999). Nucleoside analogues in the therapy of Langerhans cell histiocytosis: a survey of members of the histiocyte society and review of the literature. *Med Pediatr Oncol*, 33(5), 476-481.
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., & Linington, C. (1994). Animal models. *Ann Neurol*, 36 Suppl, S47-53.
- Wolf, A., Kabat, E. A., & Bezer, A. E. (1947). The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in the rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 6(4), 333-357.
- Wu, W. N., McKown, L. A., Moyer, M. D., & Cheung, W. (2004). Metabolism of the antineoplastic and immunosuppressive drug 2-CdA (Leustatin) in animals and humans. *Xenobiotica*, 34(6), 591-606. doi: 10.1080/00498250410001713140
- Wuest, S. C., Edwan, J. H., Martin, J. F., Han, S., Perry, J. S., Cartagena, C. M., . . . Bielekova, B. (2011). A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nat Med*, 17(5), 604-609. doi: 10.1038/nm.2365
- Yang, J. S., Xu, L. Y., Xiao, B. G., Hedlund, G., & Link, H. (2004). Laquinimod (ABR-215062) suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, modulates the Th1/Th2 balance and induces the Th3 cytokine TGF-beta in Lewis rats. *J Neuroimmunol*, 156(1-2), 3-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.02.016
- Yogev, N., Frommer, F., Lukas, D., Kautz-Neu, K., Karram, K., Ielo, D., . . . Waisman, A. (2012). Dendritic cells ameliorate autoimmunity in the CNS by controlling the homeostasis of PD-1 receptor(+) regulatory T cells. *Immunity*, 37(2), 264-275. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.025
- Zerrahn, J., Held, W., & Raulet, D. H. (1997). The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell*, 88(5), 627-636.

- Zhou, S., Ou, R., Huang, L., & Moskophidis, D. (2002). Critical role for perforin-, Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection. *J Virol*, 76(2), 829-840.
- Zielinski, C. E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., . . . Sallusto, F. (2012). Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature*, 484(7395), 514-518. doi: 10.1038/nature10957
- Zou, L. P., Abbas, N., Volkmann, I., Nennesmo, I., Levi, M., Wahren, B., . . . Zhu, J. (2002). Suppression of experimental autoimmune neuritis by ABR-215062 is associated with altered Th1/Th2 balance and inhibited migration of inflammatory cells into the peripheral nerve tissue. *Neuropharmacology*, 42(5), 731-739.

5.6 Lebenslauf

Stefan Hans-Peter Kraus

Helmerichstraße 31

55437 Ockenheim

06725/9377286

stkraus@outlook.com

geboren am 04. April 1984 in Koblenz, verheiratet, deutsche Staatsangehörigkeit.

Studium

ab Oktober 2003

Studium der Biologie im Studiengang Diplom an der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

ab April 2004

Beginn des Zweitstudiums der Biologie und Politikwissenschaft im Studiengang Lehramt für Gymnasien

August 2005

Erfolgreiches Ablegen der Diplom-Vorprüfung im Diplom-Studiengang Biologie und der Zwischenprüfung im Staatsexamens-Studiengang der Biologie

August 2006

Erfolgreiches Ablegen der Zwischenprüfung im Staatsexamens-Studiengang der Politikwissenschaft

Mai 2009

Erwerb aller erforderlichen Scheine zur Zulassung zur Abschlussprüfung im Staatsexamens-Studiengang der Politikwissenschaft

Oktober 2009

Erfolgreiches Ablegen der Diplomprüfungen in den Fächern Botanik, Immunologie und Mikrobiologie im Diplom-Studiengang Biologie

November 2009 – August 2010

Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Immunologie an der Universitätsmedizin Mainz bei Professor Dr. Hansjörg Schild

Seit September 2010

Anfertigung der Dissertation in der Klinik für Neurologie an der Universitätsmedizin Mainz bei Professor Dr. Frauke Zipp

September 2012

Erfolgreicher Abschluss des Ersten Staatsexamens für das Lehramt an Gymnasien der Fächer Biologie und Sozialkunde

August 2013 – Januar 2015

Vorbereitungsdienst für das Lehramt an Gymnasien als Studienreferendar an der Maria Ward-Schule, Mainz

Januar 2015

2. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien

Ab 2015

Studienrat an der Maria Ward-Schule Mainz