

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroimmunologie und klinische Multiple
Sklerose Forschung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg (ZMNH)

Direktor: Prof. Dr. Roland Martin

Phänotypische Charakterisierung des Immunzellinfiltrates in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Johannes Tobias Neumann
aus Hamburg

Hamburg, 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 03.02.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Professor Dr. R. Martin

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Professor Dr. C. Heesen

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. K. Sydow

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Das Immunsystem | 1 |
| 1.1.1 | Zellen des Immunsystems | 2 |
| 1.1.2 | Entstehung einer Immunantwort | 5 |
| 1.1.3 | Autoimmunität | 6 |
| 1.2 | Multiple Sklerose | 8 |
| 1.2.1 | Epidemiologie | 8 |
| 1.2.2 | Verlaufsformen | 8 |
| 1.2.3 | Symptome und Krankheitszeichen | 9 |
| 1.2.4 | Diagnostik | 9 |
| 1.2.5 | Therapie | 10 |
| 1.2.6 | Ätiologie und Pathologie | 12 |
| 1.3 | Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis | 14 |
| 1.3.1 | Historie | 14 |
| 1.3.2 | Modelle | 15 |
| 1.3.3 | Vergleichbarkeit der EAE mit der MS | 16 |
| 1.4 | Arbeitshypothese und Fragestellung | 18 |
| 2 | Material und Methoden | 19 |
| 2.1 | Material | 19 |
| 2.1.1 | Geräte | 19 |
| 2.1.2 | Chemikalien | 19 |
| 2.1.3 | Antikörper | 21 |
| 2.1.4 | Verbrauchsmaterial | 21 |
| 2.1.5 | Lösungen und Puffer | 22 |
| 2.1.6 | Versuchstiere | 23 |
| 2.1.7 | Software | 23 |
| 2.2 | Tierexperimente | 23 |
| 2.2.1 | Genehmigung | 23 |
| 2.2.2 | Induktion der EAE | 23 |
| 2.2.3 | Bewertung des Krankheitsgrades der Mäuse | 24 |
| 2.3 | Isolierung von ZNS-infiltrierenden Zellen zur durchflußzytometrischen Analyse | 26 |
| 2.3.1 | Perfusion | 26 |
| 2.3.2 | Präparation der Organe | 26 |
| 2.3.3 | Zellaufreinigung | 27 |
| 2.4 | Durchflußzytometrie | 28 |
| 2.4.1 | Prinzip | 28 |
| 2.4.2 | Färbungen | 30 |
| 2.4.3 | Kompensation | 31 |
| 2.5 | Histologie | 32 |
| 2.5.1 | Töten der Tiere, Perfusion | 32 |
| 2.5.2 | Paraffinblöcke | 33 |
| 2.5.3 | Färbungen | 33 |
| 2.5.3.1 | Entparaffinieren | 33 |
| 2.5.3.2 | Hämatoxylin-Eosin | 33 |
| 2.5.3.3 | Luxol | 34 |
| 2.5.3.4 | Bielschowsky | 34 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3 | Ergebnisse | 35 |
| 3.1 | Krankheitsverlauf | 35 |
| 3.2 | Durchflusszytometrische Identifizierung und Quantifizierung des Immunzellinfiltrates | 36 |
| 3.2.1 | Etablierung der 7-Farben-Durchflusszytometrie | 36 |
| 3.2.2 | Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen | 37 |
| 3.2.3 | TruCount® Beads ermöglichen eine absolute Quantifizierung der ins ZNS infiltrierenden Zellen | 39 |
| 3.3 | Dynamik infiltrierender Immunzellen während der EAE | 40 |
| 3.4 | Antigen-präsentierende Zellen | 43 |
| 3.4.1 | MHCII und CD80 werden in der akuten EAE stärker exprimiert | 44 |
| 3.5 | T-Zell-Aktivierung | 46 |
| 3.5.1 | Der Anteil der CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen steigt im Verlauf der EAE an | 46 |
| 3.6 | Natürliche Killer-Zellen | 48 |
| 3.6.1 | NK-Zellen bilden den größten Anteil an NK1.1 ⁺ Zellen | 48 |
| 3.6.2 | ZNS-infiltrierende NK-Zellen und NKT-Zellen zeigen unterschiedliche Oberflächenexpression der Marker CD11b, CD11c und B220 | 49 |
| 3.7 | Histologie | 51 |
| 4 | Diskussion | 53 |
| 4.1 | Die 7-Farben Durchflusszytometrie ermöglicht eine umfassende Analyse der ins ZNS-infiltrierenden Immunzellen | 53 |
| 4.2 | Das Immunzellinfiltrat | 54 |
| 4.3 | APZ infiltrieren in der akuten EAE und werden stark aktiviert | 56 |
| 4.4 | NK-Zellen – Eine heterogene Population | 57 |
| 5 | Zusammenfassung | 60 |
| 6 | Abkürzungsverzeichnis | 62 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 64 |
| 8 | Danksagung | 73 |
| 9 | Eidesstattliche Erklärung | 74 |

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen, welches den Körper vor potentiellen Gefahren wie einem fremden Krankheitserreger oder einer mutierten körpereigenen Zelle schützt. Wirbeltiere verfügen zusätzlich zu einer angeborenen Immunabwehr, zu welcher einfache Schutzbarrieren und eine unspezifische zellvermittelte Abwehr gehören, über eine komplexe, adaptive Immunabwehr.

Die angeborene zellvermittelte Immunabwehr bietet prinzipiell Schutz vor allen Arten von Pathogenen, basiert jedoch auf der Erkennung besonderer Strukturen mehrerer Pathogene und wirkt somit nicht spezifisch gegen das Pathogen. Zu diesen Strukturen gehören Oberflächenmoleküle wie Lipopolysaccharide (LPS), Mannose glykosylierter Proteine und Proteoglykane, wie sie hauptsächlich auf Bakterien vorkommen, aber auch virale DNA- und RNA-Strukturen. Die keimbahnkodierte Rezeptoren, die diese Erkennung vermitteln, werden als PAMP- (*engl.* pathogen associated molecular pattern)- Rezeptoren bezeichnet. Zu diesen Rezeptoren gehört unter anderem die Gruppe der TOLL-ähnlichen Rezeptoren (*engl.* Toll-like receptors, kurz: TLR). Die verschiedenen TLR erkennen jeweils unterschiedliche Strukturen, wie Lipide, Proteine oder DNA-Motive. So erkennt z.B. der TLR-4 Lipopolysaccharide auf der Zelloberfläche von Bakterien. Andere Rezeptoren zur Erkennung körperfremder Strukturen sind C-Typ-Lektin-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren sowie Komplementrezeptoren.

Durch die Bindung eines Liganden auf der Zelloberfläche oder in phagozytierten Vesikeln werden durch diese Rezeptoren verschiedene Signalkaskaden in der Zelle des angeborenen Immunsystems ausgelöst, welche die Genexpression verändern und die Freisetzung von entzündlichen Botenstoffen, z.B. den Zytokinen, beeinflussen.

Neben der zellvermittelten angeborenen Immunabwehr spielt in der Abwehr von Bakterien noch das Komplementsystem eine wichtige Rolle. Es beschreibt eine Gruppe von ca. 30 Proteinen, die gelöst oder zellgebunden vorkommen und im Zuge einer Infektion aktiviert werden können. Das Komplementsystem erfüllt im Wesentlichen drei Aufgaben: Einige Komplementfaktoren wirken als Strukturproteine und ermöglichen eine bessere Erkennung des Pathogen durch Phagozyten

(Opsonisierung). Andere Komplementfaktoren wirken direkt als Chemokine und führen somit zu einer Entzündungsreaktion und wiederum andere können durch Porenbildung in der Zellwand des Pathogens eine Zellyse verursachen.

Die adaptive Immunabwehr zeichnet sich durch ihre hohe Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen und veränderten Krankheitserregern aus. Die adaptive Immunabwehr wirkt im Vergleich zur angeborenen Immunabwehr verzögert, bietet dann aber eine sehr viel spezifischere und effektivere Abwehr. Antigenpezifität des adaptiven Immunsystems vermitteln vor allem die Lymphozyten. Ihre enorme Vielfalt an Oberflächenrezeptoren, wie T-Zell-Rezeptoren, B-Zell-Rezeptoren und sezernierten Antikörpern gewährleistet die spezifische Erkennung nahezu aller Krankheitserreger. Diese vielfältigen Moleküle entstehen in den Lymphozyten durch somatische Rekombination, ungenaue Verknüpfung und speziell bei B-Zellen durch somatische Hypermutation des Genoms. Der langfristige Schutz vor Pathogenen entsteht durch die Differenzierung von Lymphozyten zu Gedächtniszellen, die bei wiederholtem Kontakt mit einem Pathogen schneller Effektormechanismen einleiten können. Beispielsweise können B-Gedächtniszellen unmittelbar spezifische Antikörper sezernieren. Diesen Effekt macht man sich bei einer Impfung zunutze (Murphy et al., 2008).

1.1.1 Zellen des Immunsystems

Alle Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab, aus denen durch lymphoide oder myeloide Differenzierung die verschiedenen Zellen des Immunsystems entstehen.

Die Phagozyten bilden zahlenmäßig den größten Teil der angeborenen Immunabwehr. Sie differenzieren aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle in basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten, Monozyten, die weiter zu Makrophagen und dendritischen Zellen differenzieren, sowie Mastzellen.

Granulozyten, Monozyten und Makrophagen erkennen Antigene über diverse Oberflächen-Zucker-Moleküle (PAMP-Rezeptoren, siehe oben) und können diese durch Phagozytose in sich aufnehmen. Über intrazelluläre Signalwege kommt es dann zu weiteren Immunreaktionen, wie zur Produktion antibakterieller Sauerstoffradikale oder Proteine (Lysozym, Lactoferrin, Defensine), sowie zur Sezernierung von Zytokinen. Somit wird zum einen das Pathogen direkt bekämpft und zum anderen eine Entzündungsreaktion ausgelöst.

Mastzellen sind durch die Ausschüttung von Histamin vor allem an allergischen Reaktionen beteiligt, spielen aber auch bei der Bekämpfung von Parasiten eine wichtige Rolle.

Natürliche Killer (NK)-Zellen sind lymphozyten-ähnliche Immunzellen des angeborenen (natürlichen) Immunsystems. Ihre Funktion besteht unter anderem im Abtöten virusinfizierter Zellen wodurch sich ihr Name erklärt. Sie exprimieren auf ihrer Zelloberfläche inhibitorische (*engl.* killer-cell inhibitory receptors, KIR) und aktivierende Rezeptoren (*engl.* killer-cell activating receptors, KAR). Die KIRs binden an MHC I Moleküle (*engl.* major histocompatibility complex) auf fremden Zellen und supprimieren bei Erkennen einer gesunden Zelle und deren MHC I die Aktivität der KARs, welche sonst eine Kaskade zur Zellabtötung einleiten würden. Wird eine Zelle durch ein Virus infiziert, so kann es zu einer Reduktion der Produktion von MHC I Molekülen kommen. Fehlt der inhibitorische Reiz, so überwiegt die Aktivität der KARs und die NK-Zelle sezerniert zytotoxische Granula, die Perforine und Granzyme enthalten, oder exprimiert CD95-Ligand (Fas-Ligand), woraufhin in der infizierten Zelle über Interaktion mit Fas Apoptose induziert wird. Im Menschen differenziert man NK-Zellen aufgrund ihrer CD56-Expression in zwei Untergruppen nach ihrer Zytokinproduktion bzw. ihrer Zytotoxizität. Dies ist analog in der Maus mittels CD27 möglich, da CD56 auf NK-Zellen der Maus nicht exprimiert wird (Hayakawa et al., 2006). Zur weiteren Unterscheidung hinsichtlich des Grades der Aktivierung und der Differenzierung können die Oberflächenmarker CD11b, CD11c und B220 dienen. Einzelne Arbeiten zeigten, dass die Expression von CD11c während der Aktivierung einer NK-Zelle reduziert wird und im Verlauf erneut ansteigt. Eine CD11b Expression zeigen vor allem jene Subtypen der NK-Zellen, die Zytokine produzieren, jedoch nicht zytotoxisch wirken (Aranami et al., 2006, Di Santo, 2006, Vosshenrich et al., 2007).

Neben NK-Zellen gibt es NKT-Zellen, die durch die Expression des T-Zell-Rezeptors charakterisiert sind und Ähnlichkeiten mit T-Zellen aufweisen. Sie können ebenfalls zytotoxisch wirken, jedoch auch regulatorische Funktionen ausüben, indem Antigen-präsentierende Zellen (APZ) und T-Zellen aktiviert oder inhibiert werden können.

Lymphozyten sind zentraler Bestandteil der adaptiven Immunabwehr. Man unterscheidet je nach Reifungsort zwischen T- (Thymus) und B- (Knochenmark, *engl.* Bone marrow) Lymphozyten. T-Lymphozyten lassen sich weiter in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen unterteilen, die unterschiedliche Aufgaben ausüben.

CD8⁺ T-Zellen sind zytotoxische (Killer) T-Zellen und stellen neben NK-Zellen eine weitere Zellpopulation der zellvermittelten zytotoxischen Abwehr gegen infizierte körpereigene Zellen dar. Sie erkennen den MHC I Komplex, der auf nahezu jeder kernhaltigen Körperzelle exprimiert wird und wirken ebenfalls durch Sekretion von zytotoxischer Granula oder durch Expression von CD95-Ligand (Fas-Ligand) und können damit virusinfizierte Zellen direkt töten.

CD4⁺-Zellen sind in der Lage, Antigene, die über den MHC II Komplex auf APZ präsentiert werden, mit dem T-Zell-Rezeptor (TZR) zu erkennen. Es entsteht eine enge Bindung zwischen CD4⁺ T-Zelle und APZ, in welcher es durch Kostimuli und Zytokinfreisetzung zu einer bidirektionalen Aktivierung der Zellen kommt. Naive CD4⁺ Zellen differenzieren je nach vorherrschendem Zytokinmilieu weiter in T_H1-, T_H2-, T_H17- und T_{reg}- Zellen (Mosmann et al., 1986, Aggarwal et al., 2003). T_H1-Zellen stimulieren vor allem Makrophagen zur Abtötung phagozytierter Pathogene, T_H2-Zellen helfen B-Lymphozyten bei der weiteren Differenzierung und T_H17-Zellen verstärken die Wirkung neutrophiler Granulozyten. Vor allem für T_H1-Zellen und T_H17-Zellen konnte in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) eine zentrale Bedeutung in der akuten Immunantwort nachgewiesen werden (Aranami and Yamamura, 2008, Kebir et al., 2007, Korn et al., 2009, Stromnes et al., 2008).

Neben CD4⁺-Effektor-T-Zellen, die antigenspezifisch expandieren und eine Immunantwort gegen dieses Antigen auslösen, existieren verschiedene weitere CD4⁺ Subpopulationen, die diese Effektor-T-Zellen supprimieren. In den letzten Jahren wurden verschiedene dieser supprimierenden CD4⁺ Subpopulationen beschrieben, beispielweise CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg), Tr1-Zellen, γδ T-Zellen, HLA-G exprimierende CD4⁺-T-Zellen (Bach, 2003, Gershon and Kondo, 1970, Harrison et al., 1996). CD4⁺CD25⁺ nTregs sind die am besten charakterisierten regulatorischen T-Zellen. Sie können durch direkte Stimulation ihren sonst anergen Zustand verlassen und sowohl durch Sekretion der Zytokine IL-4, IL-10 und TGF-β als auch durch direkten Zell-Zell-Kontakt die Effektor-T-Zell-Aktivität supprimieren (Campbell and Koch, 2011, Wing et al., 2005, Zhu et al., 2010, Zwar et al., 2006).

B-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort. Über den B-Zell-Rezeptor erkennen sie Antigene und sind nach Differenzierung zu Plasmazellen in der Lage, spezifische Antikörper gegen einen Krankheitserreger zu

sezernieren, wodurch dieser durch Neutralisierung, Opsonisierung oder Komplement-Aktivierung effektiv abgetötet wird.

Um es den Zellen des Immunsystems zu ermöglichen, zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen zu unterscheiden, präsentiert prinzipiell jede kernhaltige Körperzelle ein Haupt-Gewebeverträglichkeitskomplex (*engl.* major histocompatibility complex, MHC) I Molekül auf der Zelloberfläche. Beim Menschen spricht man vom HLA Molekül (*engl.* Human Leucocyte Antigen). MHC I dient der Immunerkennung durch CD8⁺-Zellen und NK-Zellen, die gegebenenfalls infizierte körpereigene Zellen direkt abtöten können.

MHC II wird auf Antigen präsentierenden Zellen (APZ), wie Makrophagen, Mikroglia und dendritischen Zellen exprimiert und präsentiert Proteine, die in die Zelle aufgenommen wurden. Anders als B-Zellen, erkennen T-Zellen Antigene nur als Peptidfragmente des Antigens, die auf dem MHC II Komplex präsentiert werden (Murphy et al., 2008).

1.1.2 Entstehung einer Immunantwort

Wenn ein Krankheitserreger in den menschlichen Körper eindringt, so findet der erste Kontakt meistens auf den Schleimhäuten statt. Die Schleimhäute stellen eine mechanische Barriere dar, welche das Eindringen des Antigens oder infektiösen Agens verhindern kann. Neben dem Schleim können auch ein niedriger pH-Wert, bestimmte Enzyme (z.B. Lysozym) und Immunzellen, wie Makrophagen, NK-Zellen und Granulozyten als Schutz vor dem Eindringen dienen. Die meisten Erreger werden über diese Mechanismen bereits erfolgreich bekämpft.

Kann ein Krankheitserreger nicht allein durch das angeborene Immunsystem erfolgreich bekämpft werden, werden Zellen des adaptiven Immunsystems aktiviert. Antigene eines Krankheitserregers können durch diverse Oberflächenmoleküle (PAMP-Rezeptoren, siehe oben) von einer Antigen präsentierenden Zelle erkannt und in das Zellinnere aufgenommen werden. Die MHC II Moleküle der APZ werden in Endosomen mit dem Antigen beladen und präsentieren anschließend das Antigen auf der Zelloberfläche. So beladen wandert die APZ in die sekundären Lymphorgane (wie z.B. Lymphknoten und Milz), wo es zu einer Hochregulation von kostimulatorischen Proteinen kommt.

Bei einem Erstkontakt werden die von der APZ präsentierten Fremdartigene von naiven CD4⁺ T-Zellen erkannt, die daraufhin in den aktivierten Zustand übergehen. Sie beginnen sich zu teilen und produzieren Wachstumsfaktoren und Zytokine. Zur

vollständigen Differenzierung der naiven $CD4^+$ T-Zelle sind jedoch kostimulatorische Signale nötig. Die Co-Faktoren-Verbindung von CD80/CD86 und CD28 stimuliert die T-Zelle zur Sekretion von IL-2, einem T-Zell-Wachstumsfaktor, und die gleichzeitige Aktivierung führt zur Expression des IL-2-Rezeptors. Dies wiederum führt zur Proliferation der T-Zelle. Weiterhin sezerniert die APZ je nach Kontext unterschiedliche Zytokine, die zur weiteren Differenzierung der T-Zelle beitragen. Je nach vorhandenem Zytokinmilieu differenziert die naive $CD4^+$ T-Zelle nun weiter zu einem T-Zell-Subtypen. Liegen Stimulus und Kostimulus nicht gemeinsam vor, so geht die T-Zelle in einen anergen Zustand über.

Jede Lymphozyten-Subpopulation hat dann eine eigene Funktion in der spezifischen Immunantwort. So aktivieren vereinfacht gesagt T_H1 Zellen die APZ, worauf diese die aufgenommenen Pathogene abtöten. T_H2 Zellen stimulieren die B-Lymphozyten zur weiteren Differenzierung. B-Zellen können daraufhin zu Plasmazellen differenzieren, die dann spezifische Antikörper (Immunglobuline) sezernieren, um gezielt das Fremdantigen zu zerstören. Langfristig können sich B-Zellen auch zu sogenannten Gedächtniszellen entwickeln, die dann bei einem wiederholten Kontakt mit dem Fremdantigen sofort spezifische Antikörper produzieren (Murphy et al., 2008).

1.1.3 Autoimmunität

Unter Autoimmunität versteht man eine Immunreaktion, die gegen Strukturen des eigenen Organismus gerichtet ist. Die Grundvoraussetzung für eine Autoimmunreaktion ist das Vorhandensein autoreaktiver Immunzellen oder Antikörper.

An der Entstehung von Autoimmunerkrankungen können viele Faktoren beteiligt sein. Eine Möglichkeit zur Entstehung von Autoimmunität ist ein Fehler in der Entwicklung der Lymphozyten. T-Lymphozyten wandern nach ihrer Entstehung im Knochenmark als unreife Zellen in den Thymus, wo zunächst eine Reifung zu $CD4$ oder $CD8$ positiven T-Zellen stattfindet. Während der Reifung erfolgt im Thymus eine Selektion defekter oder autoreaktiver T-Zellen, die als zentrale Toleranz bezeichnet wird. Man unterscheidet dabei zwischen der positiven und der negativen Selektion. Grundlage für die erfolgreiche Ausreifung einer T-Zelle ist die Funktionalität des TCR, damit Peptide auf dem MHC Komplex grundsätzlich erkannt werden (positive Selektion). Zusätzlich dürfen T-Zellen keine zu hohe Affinität gegenüber körpereigenen Peptiden haben, die auf MHC Komplexen von dendritischen Zellen präsentiert werden (negative Selektion).

Im Thymus können jedoch nicht alle körpereigenen Peptide präsentiert werden. Es sind daher in jedem Organismus autoreaktive T-Zellen nachweisbar, die durch weitere Mechanismen kontrolliert werden (Burns et al., 1983, Martin et al., 1990, Pette et al., 1990). Diese Mechanismen werden als periphere Toleranz bezeichnet. Es werden dabei vier Kontrollmechanismen unterschieden. Zunächst ist es möglich, dass das körpereigene Epitop, auf welches die T-Zelle autoreaktiv reagieren würde, nur in geringem Maße exprimiert wird und somit von der T-Zelle nicht wahrgenommen wird. Es handelt sich bei diesem Mechanismus um Ignoranz. Weiterhin erfolgt die Aktivierung der T-Zelle nur, wenn neben dem Antigenkontakt eine Co-Stimulation durch eine APZ stattfindet. Ist dies nicht der Fall, weil es sich bei dem erkannten Antigen zum Beispiel um eine körpereigene Struktur handelt, so geht die T-Zelle in Anergie über und kann somit nicht weiter aktiviert werden. Die dritte Möglichkeit der Kontrolle erfolgt bei einer zu starken Aktivierung der T-Zelle. Ist die Aktivierung der T-Zelle zu stark, weil es sich bei dem erkannten Antigen zum Beispiel um ein häufig vorkommendes körpereigenes Epitop handelt, so erfolgt der Übergang in die Apoptose, das heißt Deletion. Die letzte bekannte Kontrollmöglichkeit in der Peripherie erfolgt durch regulatorische T-Zellen. Diese Zellen können durch Zell-Zell-Kontakte mit APZ sowie durch die Freisetzung der Zytokine IL-10 und TGF- β zu einer Suppression der T-Zell-Antwort führen.

Neben einem Fehler in den bisher beschriebenen Kontrollmechanismen gibt es die Möglichkeit, dass Autoimmunität durch äußere Einflüsse entsteht. So ist es möglich, dass normal selektionierte T-Zellen, die mit niedriger Affinität Autoantigen erkennen können, in der Peripherie ein Fremdpathogen antreffen, welches Epitope aufweist, die jenen Epitopen auf körpereigenen Zellen ähnlich sind und somit als kreuzreaktiv bezeichnet werden. Es kommt zu einer Aktivierung der T-Zelle, die nun auch ein körpereigenes, krossreaktives Peptid erkennen und somit eine Autoimmunreaktion auslösen könnte. Diesen Vorgang bezeichnet man als molekulares Mimikry (Fujinami and Oldstone, 1989).

Eine weitere Möglichkeit stellt die sogenannte „bystander Aktivierung“ dar. Man vermutet, dass autoreaktive T-Zellen dabei T-Zellrezeptor-unabhängig stimuliert werden können, wenn sie durch Zytokine, Superantigene oder PAMP-Rezeptoren aktiviert werden. Dies kann zum Beispiel bei einer Infektion der Fall sein.

Entscheidend ist dabei, dass mehrere Faktoren zusammenwirken müssen, bis es zu einer Autoimmunreaktion kommt (Sospedra and Martin, 2005, Murphy et al., 2008).

1.2 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose ist eine in der Regel schubförmig verlaufende, chronische Entzündung von Gehirn und Rückenmark. Die Krankheit wurde 1868 zum ersten Mal von J.M. Charcot beschrieben, der bei einem Patienten die Trias aus Nystagmus, skandiertem Sprechen und Intentionstremor beobachtete (Charcot, 1886). Das neuropathologische Korrelat mit multiplen, sklerotischen Plaques gab der Krankheit ihren Namen.

1.2.1 Epidemiologie

Die Prävalenz der Multiplen Sklerose liegt in Deutschland bei 70-120/100.000 Einwohnern und variiert international zwischen 6-200/100.000. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen 20 und 40 Jahren. Frauen sind 2-3 mal häufiger betroffen. Bezogen auf die Prävalenz findet man ein Nord-Süd-Gefälle, wobei die Prävalenz in Nordeuropa und Nordamerika mit 60-200/100.000 deutlich höher ist, als zum Beispiel in Asien und Afrika (6-20/100.000). Um den Äquator ist die Prävalenz am niedrigsten, südlich Richtung Australien steigt sie wieder an (Masuhr and Neumann, 2005).

1.2.2 Verlaufsformen

Multiple Sklerose weist verschiedene Verlaufsformen auf, deren Unterscheidung Auswirkungen auf die Therapie hat. Der überwiegende Anteil aller Fälle (ca. 80-85%) verläuft schubweise, wobei die schubförmig-remittierende MS (*engl. relapsing-remitting* (RRMS)) die häufigste Verlaufsform ist. Meist sind die Störungen zunächst reversibel, wobei die Krankheit jedoch in der Mehrzahl der Fälle in eine sekundär progressive Phase (SPMS) übergeht, bei welcher es ohne Schübe zu einer kontinuierlichen Verschlechterung kommt.

Seltener ist die primär-progressive Form (PPMS), die nur ca. 10% aller Patienten betrifft und bei welcher es direkt zu einer irreversiblen Schädigung kommt. Diese Verlaufsform hat eine schlechtere Prognose und betrifft Männer und Frauen gleich häufig (Thompson et al., 1997, Weinshenker et al., 1989).

1.2.3 Symptome und Krankheitszeichen

Je nach Lokalisation der Entzündung kommt es zu unterschiedlichen neurologischen Ausfällen, wie Paresen, Sensibilitätsstörungen oder Koordinationsstörungen. Die Symptome können sich auf eine Extremität oder Körperhälfte beschränken, können sich aber auch querschnittsartig ausbreiten. Typischerweise lassen sich die Befunde nicht auf eine einzelne Läsion zurückführen. Die Erstmanifestation erfolgt bei einem Drittel der Patienten mit einer Entzündung des Sehnerven (Optikusneuritis). Später treten motorische, zerebelläre, autonome und neurokognitive Störungen auf, die in unterschiedlicher Ausprägung vorliegen können und die Schwere des Verlaufes bestimmen (Masuhr and Neumann, 2005).

1.2.4 Diagnostik

Erste Hinweise für das Vorliegen von MS können sich durch die zeitliche und räumliche Verteilung von ZNS-Symptomen bei jungen Erwachsenen ergeben. Es lassen sich keine spezifischen Befunde erheben, jedoch können nach Ausschluss anderer Ursachen eine Liquoruntersuchung und eine MRT-Aufnahme die Diagnose festigen.

Im Nervenwasser (Liquor), welches Gehirn und Rückenmark zum Schutz umgibt, können bei 60-80% der Erkrankten eine Pleozytose (Vermehrung von Zellen) und ein Anstieg des Immunglobulins G (IgG, Teil der humoralen Abwehr) nachgewiesen werden. Bei über 90% aller Patienten sind bei einer isoelektrischen Fokussierung sogenannte oligoklonale Banden nachweisbar. Diese Banden sind eine Untergruppe der Gammaglobuline und weisen auf eine chronisch ablaufende Entzündung im ZNS hin.

Mittels Magnetresonanztomographie (MRT) von Gehirn und Rückenmark können entzündliche sowie Entmarkungsläsionen identifiziert werden. Nach Gabe des Kontrastmittels Gadolinium kommt es nur in aktiven, frischen Läsionen nach Öffnung der Blut-Hirn-Schranke zu einer Anreicherung. So kann von älteren Schäden differenziert werden, was Auswirkungen auf die Therapie haben kann.

Seit 2001 dienen die von einer internationalen Gruppe erarbeiteten McDonald Kriterien als Leitfaden für die Diagnostik. Demnach gilt eine MS bereits dann als erwiesen, wenn sich nach einem ersten Schub mit neurologisch nachweisbaren Defiziten im Liquor MS-typische Veränderungen (intrathekale IgG-Synthese) zeigen, zwei oder mehr charakteristische Läsionen in der initialen MRT zu finden sind und in

der Verlaufs-MRT (≥ 3 Monate nach Schubereignis) mehrere entzündliche Herde in definierter Verteilung vorhanden sind, wovon mindestens einer Gadolinium anreichert. Kommen typische Symptome erstmalig vor, so spricht man von einer CIS (*engl.* clinically isolated syndrome). Ca. 50% aller Fälle entwickeln sich dann weiter zu einer MS (McDonald et al., 2001, Rieckmann and Toyka, 2004).

Differentialdiagnostisch müssen bei einer MS Hirn- und Rückenmarkstumoren, eine Neuroborreliose sowie eine funikuläre Myelose und eine Reihe seltener, anderer Erkrankungen in Betracht gezogen werden.

1.2.5 Therapie

Es gibt keine kausale Therapie der MS. Aktuelle Therapien haben im Wesentlichen drei Ansatzpunkte.

Im akuten Schub ist Kortisongabe Mittel der Wahl. Die Gabe erfolgt für drei bis fünf Tage intravenös mit einer Dosis von 1000mg pro Tag (Grauer et al., 2001).

Bei den langfristigen Therapieoptionen unterscheidet man zwischen immunmodulatorischen und immunsuppressiven Medikamenten. Zur Gruppe der immunmodulatorischen Medikamente zählen Glatirameracetat (Copolymer-1, Handelsname Copaxone®), beta-Interferone (Betaferon®, Avonex®, Rebif®, Extavia®), Natalizumab (Tysabri®) und seit kurzem Fingolimod (Gilenya®).

Glatirameracetat ist ein synthetisches Polypeptid und besteht aus den vier Aminosäuren Glutamat, Lysin, Alanin und Tyrosin. Über eine Reihe von nicht vollständig verstandenen Mechanismen führt es zur Reduktion der Schubrate (Bornstein et al., 1984, Lisak et al., 1983). Auch in Langzeitstudien zeigten sich eine gute Wirksamkeit sowie geringe Nebenwirkungen (Ford et al., 2006).

Das Zytokin beta-Interferon wird im Körper von Fibroblasten und vielen anderen Zellen gebildet und kann zur Langzeitbehandlung von MS subkutan (s.c.) oder intramuskulär (i.m.) gespritzt werden. Es hat antivirale und antiproliferative Wirkung, geht mit einer Reihe von Nebenwirkungen (wie Kopf- und Gliederschmerzen) einher, wird jedoch insgesamt gut vertragen (Jacobs et al., 1987, Manfredonia et al., 2008). Seine immunmodulative Wirkung zeigt sich zum Beispiel in der Stimulierung der antiinflammatorische Interleukine 4 und 10 (Rothuizen et al., 1999, Yong et al., 1998). Weiterhin konnte eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung, der Block der Produktion freier Sauerstoffradikale durch mononukleäre Phagozyten, sowie eine reduzierte Expression von MHC II Molekülen nachgewiesen werden (Dhib-Jalbut, 2002).

Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen α 4-Integrin (*engl.* very late antigen-4, kurz VLA-4). Das VLA-4 Integrin, welches in der CD-Einteilung die Nummer 49d hat, dient vor allem den aktivierten T-Lymphozyten zur Adhäsion an der Endothelwand im Gehirn. Adhäsionspartner ist dabei der VCAM-1 Ligand auf der Endothelwand. So kommt es bei Blockierung des VLA-4 zur verminderten Adhäsion und somit zur verminderten Einwanderung der Leukozyten in das Gehirn, was eine schwächere Immunreaktion zur Folge hat (Kent et al., 1995, Polman et al., 2006, Yednock et al., 1992).

Fingolimod (Gilenya®) stellt das erste oral verfügbare, immunmodulatorisch wirkende Medikament dar. Es wirkt als Agonist von Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren und ist deutlich wirksamer als die oben genannten Erst-Therapien Glatirameracetat und beta-Interferone (Cohen et al., 2010, Kappos et al., 2010).

Als immunsuppressive Medikamentente kommen Azathioprin (Imurek®), Mitoxantron (Ralenova®) und Cyclophosphamid (Endoxan®) zum Einsatz. Alle immunsuppressiven Medikamente hemmen über verschiedene Mechanismen die Proliferation der sich schnell teilenden Immunzellen. Da sie jedoch teils mit starken Nebenwirkungen einhergehen, finden sie erst in der Eskalationstherapie, bei Versagen der vorherigen Therapie, eine Anwendung.

In der Zukunft sind auf dem Gebiet der monoklonalen Antikörper (mAk) einige vielversprechende Therapieoptionen zu erwarten (Gold and Rieckmann, 2007, Lutterotti and Martin, 2008). Auf drei mAk, die sich bereits in klinischer Erprobung befinden, möchte ich kurz eingehen.

Alemtuzumab (Campath 1H®) ist ein monoklonaler Antikörper gegen das T-Zell-Oberflächenmolekül CD52. Er wirkt vermutlich vor allem über eine Zerstörung der CD4⁺, aber auch der CD8⁺ T-Zellen (Paolillo et al., 1999, Reiff, 2005).

Der mAk Rituximab (Mabthera®) ist gegen das CD20 Molekül gerichtet, welches ausschließlich auf B-Zellen vorkommt und diese selektiv zerstört. Er ist bereits in der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen erprobt und befindet sich derzeit in der klinischen Erprobung an MS-Patienten (Cross et al., 2006, Hauser et al., 2008, Rastetter et al., 2004).

Daclizumab ist ein mAk gegen CD25, die Alphakette des IL-2 Rezeptors. Ziel ist es dabei, die Proliferation autoreaktiver T-Zellen zu unterbinden (Bielekova et al., 2004, Rose et al., 2004, Bielekova et al., 2009). Eingesetzt wird der Antikörper bereits in der Therapie von Leukämien und der Prävention von Allograft-

Transplantatabstoßungen (Waldmann, 2007). In mehreren Phase-II-Studien zeigte sich bei MS-Patienten eine deutliche Reduktion der Gadolinium aufnehmenden Läsionen (Wynn et al., 2010).

1.2.6 Ätiologie und Pathologie

Die Pathogenese der Erkrankung ist nicht vollständig verstanden. Als Auslöser der Krankheit werden derzeit sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren diskutiert.

Die MS wird durch autoreaktive CD4⁺ T-Zellen vermittelt, welche im ZNS eine Immunreaktion hervorrufen. Es wird vermutet, dass autoreaktive CD4⁺ T-Lymphozyten in der Peripherie durch einen nicht verstandenen Mechanismus aktiviert werden und dann in das zentrale Nervensystem (ZNS) einwandern. Beobachtungen, dass es nach viralen Infektionen häufiger zu einem Schub kommt, führen zu der Vermutung, dass ein viraler Auslöser die T-Lymphozyten stimulieren könnte (Sibley et al., 1985). Nach Durchwanderung der Blut-Hirnschranke kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF α , Interferon- γ und IL-2, die dann über Mikroglia, Makrophagen, Plasmazellen und NK-Zellen zu weiteren immunologischen Reaktionen führen, welche die Zerstörung der Myelinscheide zur Folge haben (Sospedra and Martin, 2005).

Folgende Ergebnisse sprechen für eine genetische Prädisposition als Einflussfaktor auf das Erkrankungsrisiko: Zwillingsstudien haben gezeigt, dass es ein genetisches Risiko gibt, an MS zu erkranken. Die Konkordanz beträgt bei monozygoten Zwillingen ca. 25%, bei Geschwistern ca. 3%. Verglichen mit der Normalbevölkerung ist das Risiko damit deutlich erhöht (Sadovnick et al., 1993, Sadovnick and Ebers, 1995, Sommer et al., 1996, Williams et al., 1980).

Zwar konnten in der Vergangenheit durch Assoziationsstudien und Linkage Analysen eine Reihe beteiligter Gene identifiziert werden, jedoch sind bislang die HLA-DR2/DR15 Allele des MHC II Komplexes die einzigen Genbereiche die 10-60% des genetischen Risikos bedingen (Paty et al., 1974). In den letzten Jahren wurden mehrere neue Gene identifiziert, die in engeren Zusammenhang mit MS gebracht werden (Oksenberg et al., 2008). Insbesondere zeigten die Gene IL2RA und IL7RA eine Korrelation mit einem erhöhten Risiko an MS zu erkranken (Hafler et al., 2007, Gregory et al., 2007, Lundmark et al., 2007).

Die Ergebnisse zahlreicher Studien zeigen, dass es eine Beteiligung von Umweltfaktoren am Erkrankungsrisiko gibt. Migrationsstudien haben gezeigt, dass Migranten, die aus Gebieten niedriger Prävalenz in Gebiete hoher Prävalenz auswandern, ein niedriges Risiko behalten, sofern sie bei Migration älter als 15 Jahre sind, umgekehrt bleibt das Risiko erhöht. Dies legt die Vermutung nahe, dass in jungen Jahren ein Umweltfaktor das Risiko zu erkranken mitbestimmt (Gale and Martyn, 1995). Als weitere Faktoren, die das Auftreten einer MS begünstigen können, werden Rauchen, Ernährungsgewohnheiten und eine verminderte Sonnenlichtexposition diskutiert. Insbesondere tierexperimentelle Arbeiten legen nahe, dass die Synthese von Vitamin D ein protektiver Umweltfaktor sein kann (Hayes, 2000, Ascherio et al., 2010). Weiterhin besteht eine Assoziation zwischen Multipler Sklerose und Virusinfektionen. Hierbei zeigte sich insbesondere bei EBV-Infektionen ein Zusammenhang zum Auftreten von MS (Alotaibi et al., 2004, Lunemann et al., 2008, Lunemann et al., 2007, Ascherio and Munger, 2010).

Neuropathologische Untersuchungen zeigen im ZNS eine Entzündungsreaktion, welche sich häufig perivaskulär befindet. Begleitet wird diese Entzündung durch die Bildung von multifokalen Entmarkungsherden (sklerotische Plaques) vor allem in den Hirnhemisphären um die Seitenventrikel, aber auch subkortikal sowie im Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark. Zelluläre Komponenten dieser Läsionen sind im wesentlichen T-Zellen und Makrophagen, sowie die von ihnen sezernierten Mediatoren und Zytokine. Bereits sehr früh kommt es bei MS jedoch auch zu einer Abnahme der axonalen Dichte und sekundären neuronalen Schädigung. Dies erklärt sich vermutlich durch mangelnde Nährstoffunterstützung aus zugrundegehenden Oligodendrozyten. Neuropathologisch lassen sich hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung und Schädigungsmechanismen verschiedenartige Läsionen unterscheiden. Lassmann unterteilte die pathologischen Muster: Muster (I) ist im wesentlichen durch T-Zellen und Makrophagen vermittelt, Muster (II) wird durch Antikörper und Komplementablagerung vermittelt, Muster (III) zeichnet sich durch eine von T-Zellen und Makrophagen ausgelöste distale Oligodendrozytendegeneration aus und Muster (IV) charakterisiert sich durch einen primären Oligodendrozytenschaden mit sekundärer Demyelinisierung (Lassmann et al., 2001, Lucchinetti et al., 2000).

1.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine durch Antigene der Myelinscheide induzierte Autoimmunerkrankung des ZNS, die als ein Tiermodell der MS genutzt wird. Ausgehend von den prominenten Entmarkungsherden bei MS wurde angenommen, dass Markscheidenbestandteile Zielstrukturen der Immunantwort bei MS sein könnten. Aus diesem Grund verwendete man Proteine bzw. Peptide des Myelins, der fetthaltigen Nervenscheide, und löste hiermit einen Autoimmunprozess aus, bei welchem es zur Entzündung und Demyelinisierung der Nervenfasern kam. Die am häufigsten verwendeten Proteine sind das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), das basische Myelinprotein (MBP) und das Proteolipid-Protein (PLP) (Gold et al., 2006). Ein anderes Tiermodell der MS stellt die Infektion mit dem Theilers murinen Enzephalomyelitis Virus (TMEV) dar. Durch Infektion mit bestimmten TMEV Stämmen lässt sich in manchen Mauslinien ebenfalls ein Autoimmunprozess mit Entzündung, Demyelinisierung und axonaler Degeneration hervorrufen (Oleszak et al., 2004).

1.3.1 Historie

Die Ursprünge der EAE lassen sich auf Louis Pasteur zurückführen, der 1885 erstmals Tollwut-Impfungen mit Tollwut Virus Präparationen durchführte, die in Kaninchenrückenmark hergestellt worden waren. In Folge dieser Impfungen kam es bei einzelnen Impflösungen zu Lähmungen, die in 30% der Fälle tödlich verliefen. Histologisch fanden sich lymphozytäre Infiltrate um die Blutgefäße sowie eine Demyelinisierung (Bassoe and Grinker, 1930). 1925 gelang es Koritschoner und Schweinburg durch Beimpfen eines Kaninchen mit menschlichem Rückenmark eine Entzündung hervorzurufen (Koritschoner and Schweinburg, 1925). 1933 führte dann Thomas M. Rivers an der Rockefeller Universität Versuche durch, um den Zusammenhang zwischen Virusinfektionen und Lähmungen zu verstehen. Seine Versuche an Rhesusaffen und Kaninchen führten ebenfalls zu Lähmungen mit gleichem histologischem Korrelat wie von Pasteur beobachtet. Für Rivers' Versuche waren allerdings bis zu 85 Injektionen pro Tier nötig, um eine Erkrankung auszulösen (Rivers and Schwentker, 1935, Rivers et al., 1933, Schwentker and Rivers, 1934). Erst nach Entwicklung von „Freund's Adjuvant“ (Freund and McDermott, 1942), welches eine Emulsion aus hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* und Paraffinöl war, das gemeinsam mit Rückenmarkhomogenat injiziert wurde, gelang es

bereits mit einer Injektion (Freund et al., 1947, Kabar et al., 1947). Die Wirkung des Adjuvants beruht vermutlich auf zwei Aspekten. Zunächst hat das Adjuvant eine Depotwirkung, welche zu einem längeren Antigenkontakt führt. Weiter ruft es eine lokale Entzündung und somit eine verstärkte Immunreaktion hervor (Herbert, 1978). Seit dieser Zeit wurde die EAE an zahlreichen Labortieren wie Meerschweinchen, Hasen, Ziegen, Mäusen, Ratten, Hamstern, Hunden, Schafen und Primaten getestet. Heute ist die Maus das am meisten genutzte Versuchstier (Baxter, 2007, Gold et al., 2006).

1.3.2 Modelle

Inzwischen gibt es eine Reihe von EAE Modellen, die an Nagetieren erprobt sind und jeweils unterschiedliche Charakteristika aufweisen. So unterscheiden sich alle Modelle teils erheblich in ihrem Krankheitsverlauf und den Ähnlichkeiten mit MS. Grob unterteilen lassen sich Modelle der aktiven EAE durch Immunisierung, des Adoptiven-Transfers und EAE in transgenen oder knockout Mäusen.

Die aktive Immunisierung kann mit den Proteinen MBP, MOG und PLP erfolgen. Am häufigsten finden die Mausstämme SJL und C57BL/6 Anwendung (seltener BALB/c und Sv129). SJL-Mäuse zeigen einen schubartigen Verlauf (relapsing-remitting), C57BL/6 Mäuse hingegen einen monophasischen Verlauf mit inkompletter Remission (Martin et al., 1992, Wekerle et al., 1994).

BiozziAHB Mäuse zeigen nach Immunisierung mit einem Rückenmarks-Homogenat einen schubartigen Verlauf mit chronischer Progression (Amor et al., 2005, Jackson et al., 2009).

Ein vergleichsweise neues Modell ist die MOG-Immunisierung von NOD-Mäusen (*engl.* kurz für non-obese-diabetic). In diesem Mausmodell kommt es nach einer akuten Phase der EAE zu einem chronisch-progressiven Verlauf mit neurologischen Defiziten (Basso et al., 2008).

Inzwischen existieren Tiermodelle für TCR-, HLA-DR- und IgM-transgene Mäuse, die unter anderem auch einen spontanen Verlauf der EAE zeigen können. Vorteil dieser Modelle ist die Möglichkeit einen spontanen Verlauf der EAE zu untersuchen, ohne eine vorangegangene Immunisierung. Der Nachteil ist allerdings, dass es sich um sehr artifizielle Modelle handelt, da ein großer Teil der Immunzellen durch die genetische Manipulation Determinanten der autoreaktiven Immunantwort exprimieren (Bettelli et al., 2006, Bettelli et al., 2003, Krishnamoorthy et al., 2006, Pollinger et al., 2009, Rich et al., 2004, Waldner et al., 2000).

Die in dieser Arbeit untersuchte MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE in C57BL/6 wurde 1995 zum ersten Mal beschrieben (Mendel et al., 1995). Untersuchungen an MS-Patienten hatten anti-MOG Antikörper gezeigt, woraufhin Mendel verschiedene synthetische MOG-Peptide untersuchte und herausfand, dass allein MOG₃₅₋₅₅ in der Lage war EAE auszulösen. Das MOG₃₅₋₅₅-Peptid befindet sich auf der äußeren Myelinschicht, welche die Nerven umgibt und stellt somit ein gutes Ziel auch für humorale Autoimmunmechanismen dar. Nach 11-15 Tagen kam es im Tierversuch zu Lähmungen, die meist nur den Schwanz und die Hinterbeine betrafen. Anschließend ging die EAE in eine chronische Phase über, die auch nach drei Monaten nicht rückläufig war. Die Ergebnisse waren dabei mit bis zu 100% höchst reproduzierbar. Bisher veröffentlichte Studien zur MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE beschäftigten sich zum großen Teil mit der histologischen Zusammensetzung des zellulären Infiltrates. Histologisch finden sich in diesem Modell perivaskuläre Inflammation mit T-Zell-Infiltration und Mikroglia-Aktivierung sowie axonale Degeneration und Demyelinisierung der Nervenfasern die überwiegend im zervikalen Rückenmark lokalisiert waren (Jones et al., 2008, Wujek et al., 2002). Einzelne Arbeiten korrelierten diese Ergebnisse mit einer durchflusszytometrischen Charakterisierung des Infiltrates. Hierbei war sowohl in der akuten, als auch in der chronischen Phase der größte Anteil der infiltrierenden Immunzellen CD11b⁺ und somit als Mikroglia und Makrophagen anzusehen. CD11c⁺ Zellen (dendritische Zellen) entsprachen 12-20% und B-Zellen 2-8% aller im ZNS untersuchten Immunzellen. Der Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen variierte je nach Studie zwischen 2 und 21%, bzw. 0,7 und 8% (Zhang et al., 2004, Berard et al., 2010).

1.3.3 Vergleichbarkeit der EAE mit der MS

Zwischen der EAE und der MS gibt es einige wesentliche Unterschiede. Zum einen handelt es sich bei der EAE um eine experimentell hervorgerufene Krankheit, sei es durch aktive Immunisierung, passive Auslösung (adoptiver Transfer autoreaktiver T-Zellen) oder durch Herstellung transgener Mäuse. Dies bedeutet, dass die erhaltenen Versuchsergebnisse abhängig von der Art der experimentellen Manipulation sind.

Zum Auslösen der EAE ist außerdem meist eine Aktivierung des Immunsystems (z.B. durch Adjuvant und/oder Pertussis Toxin) nötig. Weiterhin handelt es sich bei fast allen Versuchen um Inzuchttiere mit identischem genetischem Hintergrund, was die individuelle Variabilität der Erkrankungen von MS-Patienten nicht widerspiegeln kann.

All diese Aspekte legen nahe, dass ein oder mehrere Modelle der EAE nicht mit einer so heterogenen Krankheit wie MS verglichen werden können. Dennoch können einzelne Modelle spezifische Aspekte der Krankheit wiedergeben und viele der heutigen Erkenntnisse sind auf die Erforschung der EAE zurückzuführen. So konnte in der EAE die Bedeutung der CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden und auch das Prinzip des molekularen Mimikry geht darauf zurück (Bernard et al., 1976, Gold et al., 2006, Zamvil and Steinman, 1990, Fujinami and Oldstone, 1985).

Auf dem Gebiet der Medikamentenerprobung gab es in der Vergangenheit viele Fälle, in denen Substanzen im EAE-Tierversuch erfolgversprechend aussahen, in klinischen Studien an MS-Patienten jedoch keinen Effekt zeigten. Die Entwicklung der drei wichtigen Medikamente Glatirameracetat, Mitoxantron und Natalizumab ist jedoch weitestgehend auf die Erprobung in der EAE zurückzuführen (Steinman and Zamvil, 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die EAE nicht als umfassendes und alle Aspekte abbildendes Modell für MS angesehen werden darf. Teilaspekte können so jedoch nachvollzogen werden und EAE Modelle sind oft der einzige Weg, sich der Pathogenese der MS zu nähern.

1.4 Arbeitshypothese und Fragestellung

Bisherige Arbeiten zur MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE untersuchten histologische Aspekte des Infiltrates oder beschränkten sich in der Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie auf Teilaspekte des Infiltrates. Ziel dieser Arbeit ist eine umfassende Charakterisierung der Immunantwort in der chronischen Phase der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE durch qualitative und quantitative Analysen der zellulären Infiltrate.

Erster Schritt soll dabei die Etablierung einer Methode zur absoluten Quantifizierung der ins zentrale Nervensystem (ZNS) infiltrierenden Immunzellen sein. Mittels Durchflusszytometrie soll dann untersucht werden, wie stark die Einwanderung und die Aktivierung der Immunzellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Krankheit ausgeprägt sind. Sollte in der „chronischen Phase“ noch Aktivität gefunden werden, wäre zu diskutieren, ob dies auf Autoreaktivität oder auf bestehenden Schaden zurückzuführen ist.

Diese Ergebnisse sollen dann mit histologischen Untersuchungen des Rückenmarkes verglichen werden, um auf Unterschiede oder Übereinstimmungen hinzuweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Grundlage für weitere Projekte im Institut für Neuroimmunologie und klinische Multiple Sklerose Forschung (inims) dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Cryostat CM3000, Leica, Wetzlar

Durchflusszytometer BD LSR II, BD Biosciences, Heidelberg

Mikroskop Axioskop 40, Zeiss, Jena

Perfusionspumpe Reglo, Ismatec, Glattbrugg, CH

Schüttler, GFL 3013

Waage PM 4000, Mettler, Giessen

Zentrifuge Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau

Zentrifuge Multifuge 3-L, Heraeus

2.1.2 Chemikalien

25% Ammoniak, Roth, Karlsruhe

Ammoniumchlorid, AppliChem GmbH, Darmstadt

Aqua bidestillata

Bacto Adjuvants Incomplete Freund (Paraffinöl und Arlacel A), Difco Laboratories,
Heidelberg

BSA, PAA Laboratories GmbH

CO₂/O₂-Gasgemisch

CO₂ Gasflasche

Collagenase A, Roche, Grenzach-Wyhlen

Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Darmstadt

DNase I, Roche

Dulbecco's phosphate buffered saline, PAA Laboratories GmbH, Pasching, A

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, Roth

Entellan, Merck, Darmstadt

Eosin gelblich, Merck

Esel-Serum, Chemicon, Billerica, USA

10% Essigsäure, Roth

Ethanol 99%, Walter-CMP GmbH, Hamburg

FACS-Clean, BD Biosciences

FACS-Rinse, BD Biosciences
Fluoromount G, SouthernBiotech, Birmingham, USA
Formaldehyd, Roth
Isopentan, Roth
Kaliumhydrogencarbonat, Roth
Ketanest, Pfizer, Berlin
Lithiumcarbonat
Luxolechtblau MBS, Waldeck GmbH, Division Chroma, Münster
MAYERS Hämalaunlösung, Merck
MOG₃₅₋₅₅ Peptid in PBS, NeomPS, San Diego
Mycobacterium tuberculosis H37RA (inaktiviert), Difco Laboratories
Natriumazid, Roth
Natriumhydroxid, AppliChem GmbH
Natriumthiosulfat, AppliChem GmbH
Natriumzitrat-Dihydrat, Sigma, Steinheim
Paraformaldehyd, AppliChem GmbH
Percoll, GE Healthcare, München
Pertussis Toxin in PBS, *Bordetella pertussis*, Calbiochem, Darmstadt
Saccharose, Roth
Salpetersäure 65%, Merck
Salzsäure, Roth
Silbernitrat, AppliChem GmbH
TissueTek, GÜNTHER WESARG GmbH, Hamburg
Triton X-100, Roth
Xylol-Ersatz XEM-200, Vogel, Giessen
Zitronensäure, Roth

2.1.3 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für FACS-Färbungen

| Ziel | Fluorochrom | Isotyp | Klon | Firma | Verdünnung |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|------------|
| CD4 | PE | ratlgG2b, k | GK1.5 | eBioscience/NatuTec | 1:100 |
| CD8 | PaBlue | ratlgG2a, k | 5-3-6.7 | eBioscience/NatuTec | 1:30 |
| CD11b | FITC | ratlgG2b, k | M1/70 | eBioscience/NatuTec | 1:30 |
| CD11b | PerCP-Cy5.5 | ratlgG2b, k | M1/70 | BD Pharmingen | 1:30 |
| CD11c | PE-Cy7 | ArHamlgG | N418 | eBioscience/NatuTec | 1:10 |
| CD11c | APC | ArHamlgG | N418 | eBioscience/NatuTec | 1:30 |
| CD16/32 (Fc-Block) | Purified | ratlgG2a, l | 93 | eBioscience/NatuTec | 1:1000 |
| CD25 | APC | ratlgG1, l | PC61.5 | eBioscience/NatuTec | 1:30 |
| CD45 | APC-Cy7 | ratlgG2b, k | 30-F11 | BD Pharmingen | 1:10 |
| CD45R (B220) | PE-Cy5.5 | ratlgG2a, k | RA3-6B2 | eBioscience/NatuTec | 1:50 |
| CD69 | PE-Cy7 | ArHamlgG | H1.2F3 | eBioscience/NatuTec | 1:30 |
| CD80 | PE | ArHamlgG | 16-10A1 | eBioscience/NatuTec | 1:10 |
| MHCII (b,d,p,k) | FITC | ratlgG2b, k | M5/114.15.2 | eBioscience/NatuTec | 1:10 |
| NK1.1 | PE-Cy7 | mslgG2a, k | PK136 | BD Pharmingen | 1:15 |

2.1.4 Verbrauchsmaterial

96 Lochplatte mit rundem Boden, Greiner Bio One, Frickenhausen

Adapter (Adapter w/w, Braun Melsungen AG)

Cryoröhrchen, Greiner Bio One

Deckgläser, Menzel-Gläser, Braunschweig

Fixierungsröhre, Eigenbau

Färbekammer Shandon Coverplate, Thermo, Waltham, USA

Heizplatte MR 2002, Heidolph, Schwabach

Kanülen, Braun Melsungen AG

Markierungszange, World Precision Instruments Inc.

Nadeln zur Fixierung, Braun Melsungen AG

Objektträger HistoBond, Marienfeld, Lauda Königshofen

Petrischale, Greiner Bio One

Pipetten (25ml, 10ml, 5ml), Greiner Bio One

Pipettierhilfen, Integra Biosciences, Fernwald

Präparierbesteck, Roth bzw. Fine Science Tools, Heidelberg

5 ml Röhrchen, Falcon, BD Biosciences

15 ml Röhrrchen, Falcon, BD Biosciences
50 ml Röhrrchen, Falcon, BD Biosciences
Spritze (Omnifix 2ml, Luer Lock, Braun Melsungen AG)
Spritzenkopf, Braun Melsungen AG
Styroporblock
Transferpipetten, Eppendorf
Trucount Röhrrchen, BD Biosciences
Zellsieb 40 µm, BD Biosciences

2.1.5 Lösungen und Puffer

Ammoniak-Wasser (1 ml 25% Ammoniak + 100 ml Wasser)
Blockierungs-Lösung (5% Esel-Serum, 0,2% Triton X-100 in PBS lösen)
Entkalkungs-Puffer (20% EDTA in Wasser mit NaOH auf physiologischen pH-Wert eingestellt)
Entwickler-Lösung (5 ml 36% Formaldehyd + 100 ml Wasser + 1 Tropfen konz. Salpetersäure + 0,5 g Zitronensäure)
Eosin-Stammlösung (3 g Eosin in 300 ml Wasser lösen)
Eosin-Gebrauchslösung (50 ml Eosin-Stammlösung + 390 ml 96% Ethanol + 2 ml Essigsäure)
Erythrozyten-Lyse-Puffer (0,15 M NH_4Cl + 10 mM KHCO_2 + 0,1 mM Na_2EDTA bei einem pH-Wert von 7,2 – 7,4)
FACS-Puffer (0,5% BSA + 0,02% Natriumazid in PBS)
Lithiumcarbonatlösung (0,5g Lithiumcarbonat in 1000 ml Aqua bidest. lösen)
Luxol-Lösung (0,1 g Luxolechtblau in 100 ml 96% Ethanol und 5 ml 10% Essigsäure lösen)
Paraformaldehyd (PBS beinahe zum Kochen bringen, dann 4% Paraformaldehyd zugeben und bis zum vollständigen Lösen kräftig rühren lassen)
Percoll-Lösung A (5 ml Percoll + 1,84 ml mit einer Dichte insgesamt von 1,095 g/ml)
Percoll-Lösung B (1,5 ml Percoll + 5 ml D-MEM mit einer Dichte insgesamt von 1,030 g/ml)
Wasch-Lösung (0,1 % Triton X-100 in PBS)

2.1.6 Versuchstiere

Verwendet wurden weibliche C57BL/6 Mäuse aus der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Dieser Maus-Stamm ist der am meisten genutzte Inzuchtstamm und zeichnet sich durch eine geringe Tumoranfälligkeit aus. Eingesetzt werden sie als genetischer Hintergrund für viele Mutationen, wie zum Beispiel Fettleibigkeit und Diabetes. Gezüchtet wurden die Mäuse erstmals 1937 im Tierstall von Abby Lathrop. 1946 wurden diese dann an das Jackson Labor in Bar Harbor überführt, von wo aus sie auch heute noch vertrieben werden. Das maximale Gewicht von 20-25g erreichen die Weibchen ca. 12 Wochen nach ihrer Geburt. Die mittlere Lebenserwartung beträgt bei weiblichen Mäusen zwischen 23 und 29 Monate. Der MHC II Haplotyp der Mäuse ist H-2b (Harlaneurope, 2008).

2.1.7 Software

Endnote, Adept Scientific

FACS Diva, BD Biosciences

FlowJo FACS analysis software

Microsoft Excel

Microsoft Word

PRISM, Graphpad

2.2 Tierexperimente

2.2.1 Genehmigung

Die Tierexperimente wurden unter dem Tierversuchsantrag 25/07, genehmigt durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg, durchgeführt und entsprachen §9 Abs. 1 Satz 4 Tierschutzgesetz in der Fassung vom 18.05.2006. Für die selbständige Durchführung der Tierexperimente lag eine Ausnahmegenehmigung nach §9 TSchG vor.

2.2.2 Induktion der EAE

In C57BL/6 Mäusen lässt sich durch Immunisierung mit einer Emulsion aus Autoantigen (MOG₃₅₋₅₅ Peptid) in komplettem Freund's Adjuvant (CFA) eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) auslösen.

Versuchstiere:

Die Mäuse werden eine Woche vor Versuchsbeginn zur Adaptation aus der UKE Versuchstierhaltung in die ZMNH-interne Tierhaltung transferiert. Zum Zeitpunkt der Immunisierung sind die Tiere 8-10 Wochen alt.

Emulsion:

Das MOG₃₅₋₅₅ Peptid wird in PBS zu einer Konzentration von 4 mg/ml verdünnt und portioniert bei -20°C gelagert. Zur Herstellung des CFA wird inkomplettes Freund's Adjuvant (IFA) mit 4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA versetzt. Zur Erstellung einer stabilen Emulsion mit CFA werden sowohl das MOG-Peptid, als auch das CFA luftfrei jeweils mit einer Spritze aufgezogen. Beide Spritzen werden mit einem Adapter verbunden, um dann zunächst das MOG-Peptid in das CFA zu spritzen. Durch mehrfaches Mischen der Emulsion von der einen zur anderen Seite, wird eine stabile, weiße Emulsion erzeugt, die für 2 Stunden bei 8°C gekühlt wird.

Immunisierung:

Jede Maus wird subkutan an einer Injektionsstelle mit 200 µg MOG-Peptid in CFA immunisiert. Zur Immunisierung werden die Mäuse mit einem Gasgemisch aus 80% CO₂ und 20% O₂ kurzzeitig narkotisiert. Zunächst wird den Mäusen die Emulsion unter die Bauchhaut gespritzt. Im Anschluss werden die Tiere in eine Fixierungsrolle gezogen, so dass nur noch der Schwanz hervor streckt. Der Schwanz wird nun für 10 Sekunden in ein 45°C warmes Wasserbad gehalten, um die Durchblutung zu steigern. Dann wird den Mäusen 300ng Pertussis Toxin in 100µl PBS intravenös injiziert.

Zur Identifizierung werden die Mäuse mit Ohrmarken in Form von Löchern markiert. Zwei Tage später wird den Mäusen erneut 300ng Pertussis Toxin in 100µl PBS intraperitoneal injiziert.

2.2.3 Bewertung des Krankheitsgrades der Mäuse

Ab Tag 8 nach der Immunisierung werden die Mäuse täglich gewogen und nach speziellen Kriterien eingestuft. Die Kriterien geben an, inwiefern eine Beeinträchtigung der Beweglichkeit vorliegt. Zur Einstufung der Mäuse wird ein Gitter-Test durchgeführt. Dabei wird die Maus auf ein Drahtgitter gesetzt, welches dann umgedreht wird. Eine gesunde Maus kann nun problemlos kopfüber an dem

Gitter klettern und verwendet dabei zusätzlich den Schwanz, den sie um einzelne Gitterstäbe schlängelt.

Die Kriterien zur Einteilung der Krankheitsstadien sind in Tabelle 2 festgelegt.

Tabelle 2: Bewertungskriterien für den Krankheitsgrad einer Maus

| Punktzahl | Kriterium | Kommentar |
|------------------|--|--|
| 0 | Keine Krankheitssymptome | Der Schwanz kann problemlos nach oben bewegt werden und wird beim Klettern benutzt. |
| 0,5 | Schlaffer Schwanz | Die Maus verliert manchmal mit dem Schwanz den Kontakt zum Gitter. Außerdem wirkt der Schwanz hinsichtlich des Tonus schwach. |
| 1,0 | Schlaffer Schwanz | Der Schwanz hängt schlaff nach unten. |
| 1,25 | Beginnende Schwäche der Hinterbeine | Die Maus kann gut klettern, aber die Hinterbeine wirken bereits schwach. |
| 1,5 | Beginnende Schwäche der Hinterbeine | Die Maus kann sich gut am Gitter halten, aber beide Hinterbeine werden meist parallel bewegt. |
| 1,75 | Behinderung der Hinterbeine | Die Maus bewegt immer beide Hinterbeine parallel und verliert evtl. mit einem Bein den Kontakt zum Gitter. |
| 2,0 | Behinderung der Hinterbeine | Die Maus verliert in 50% der Fälle den Kontakt zum Gitter mit beiden Hinterbeinen, kann den Kontakt jedoch wieder herstellen. |
| 2,25 | Behinderung der Hinterbeine | Die Maus verliert in 75% der Fälle den Kontakt zum Gitter mit beiden Hinterbeinen, kann den Kontakt jedoch meist wieder herstellen. |
| 2,5 | Fast komplette Lähmung der Hinterbeine | Die Maus verliert in 100% der Fälle den Kontakt zum Gitter mit beiden Hinterbeinen und kann keinen Kontakt mehr herstellen. |
| 2,75 | Fast komplette Lähmung der Hinterbeine | Die Maus verliert in 100% der Fälle den Kontakt zum Gitter mit beiden Hinterbeinen und kann keinen Kontakt mehr herstellen. Der Gitter-Test ist ab diesem Stadium nicht mehr sinnvoll. Beim Bewegen im Käfig bewegt sich die Maus nur noch mit den Vorderbeinen vorwärts, kann jedoch ein Bein noch bewegen. |
| 3,0 | Komplette Lähmung der Hinterbeine | Beim Bewegen im Käfig bewegt sich die Maus nur noch mit den Vorderbeinen vorwärts. Die Hinterbeine sind komplett gelähmt. |
| 3,5 | Komplette Lähmung der Hinterbeine und Schwäche des vorderen Körpers | Die Maus bewegt sich gar nicht mehr (Depression), wäre aber noch in der Lage dazu (siehe 3,0). |
| 4 | Komplette Lähmung der Hinterbeine und Behinderung des vorderen Körpers | Die Maus bewegt sich gar nicht mehr, da Vorder- und Hinterbeine gelähmt sind. |
| 5 | Sterbend oder tot | Lähmung des gesamten Körpers. |

2.3 Isolierung von ZNS-infiltrierenden Zellen zur durchflußzytometrischen Analyse

2.3.1 Perfusion

Zur Verarbeitung von Gehirn und Rückenmark wird die Maus zunächst mit CO₂ getötet und dann mit PBS perfundiert, um das bei der Analyse störende Blut aus dem Kreislauf der Maus zu entfernen. Anschließend wird mit der Organentnahme und der Zellaufreinigung fortgefahren.

In Vorbereitung zur Perfusion der Maus gibt man den Schlauch der Perfusionspumpe in ein Gefäß mit PBS und lässt die Flüssigkeit durch das gesamte System pumpen, bis es luftleer ist. An das Ende der Pumpe steckt man eine Nadel der Dicke 0,8 mm. Ziel der Perfusion ist es, den Einfluss des Blutes auf das Ergebnis zu vermeiden.

Die Maus wird zunächst mit einem Gasgemisch aus 80% CO₂ und 20% O₂ narkotisiert und anschließend mit reinem CO₂ für 5 Minuten begast.

Die tote Maus wird mit 4 Nadeln mit dem Rücken auf einen Styroporblock gespannt. Vorsichtig eröffnet man den Brustkorb, ohne dabei ein größeres Gefäß oder das Herz zu verletzen. Nun liegt das Herz frei und man führt die Nadel der Perfusionspumpe in die linke Herzkammer ein. Die Pumpe wird mit einer Geschwindigkeit von 50 ml/min eingeschaltet. Zügig wird der rechte Herzvorhof mit einer Schere eröffnet, um den Blutausfluss zu ermöglichen. Nach fünf Minuten verringert man die Geschwindigkeit der Pumpe auf etwa 25 ml/min. Nach weiteren fünf Minuten schaltet man die Pumpe ab.

2.3.2 Präparation der Organe

Die Maus wird mit dem Brustkorb nach unten fixiert. Wichtig ist dabei vor allem die Fixierung des Kopfes (z.B. durch eine Nadel in der Nase). Mit einem langen, senkrechten Schnitt über den Rücken werden die Wirbelsäule und die Muskeln freigelegt. Die Muskeln werden nun vorsichtig – ohne die Knochen zu beschädigen – abgeschnitten. Besonders der Übergang zum Kopf muss vorsichtig und sorgfältig freigelegt werden.

Liegen nun die knöchernen Strukturen frei, so fasst man mit der Spitze einer Schere in das Foramen magnum am Schädel und schneidet den Knochen vorsichtig mittig auf. Die Schere muss dabei möglichst oberflächlich gelassen werden, um das Gehirn nicht zu beschädigen. Der Schädel wird kreuzförmig eingeschnitten. Nun können die

einzelnen Knochenstücke mit einer Pinzette einfach abgetrennt werden und das Gehirn liegt frei. Anschließend schneidet man vorsichtig die Wirbelkörper seitlich auf, um das darunter liegende Rückenmark freizulegen. Ist dies auf voller Länge geschehen, kann man das Gehirn mit einem kleinen Spatel im Schädel anheben und es mitsamt dem Rückenmark entnehmen. Es wird in 10ml PBS in einem 50ml Röhrchen auf Eis gelagert.

2.3.3 Zellaufreinigung

Das entnommene Gewebe wird in einer Petrischale mit einer Schere in möglichst kleine Stücke geschnitten und anschließend mit 5ml Verdauungslösung (1mg/mL Kollagenase + 0,1mg/mL DNaseI in D-MEM) in einem 50ml Röhrchen für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C gemischt.

Ab diesem Schritt muss permanent auf Eis gearbeitet werden.

Das nun weiche Gewebe wird kurz mit einer Pipette gemischt und anschließend mit dem Kopf einer Spritze durch ein 40µm Zellsieb gedrückt. Das homogenisierte Gewebe wird mit 10ml PBS gewaschen und zentrifugiert (300 g, 10 min, 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 5 ml eines Erythrozyten-Lyse-Puffers resuspendiert. Nach 7 Minuten Inkubation auf Eis wird das Gefäß mit PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10ml PBS resuspendiert. Es folgt erneut eine Zentrifugation und der Überstand wird abgossen.

Zur Abtrennung der infiltrierenden Immunzellen und Mikroglia von anderen Zellen und dem im ZNS enthaltenen Myelin wird eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu werden zwei Lösungen unterschiedlicher Dichte hergestellt. Das Pellet wird zunächst in 3ml der Percoll-Lösung B resuspendiert und in ein 15ml Röhrchen überführt. Mit einer Pipette werden nun 3ml der Percoll-Lösung A aufgezogen und vorsichtig unter die Lösung B pipettiert, so dass sich zwei Phasen bilden.

Dieser Gradient wird nun bei 1350g für 30 Minuten bei 4°C unter minimaler Beschleunigung zentrifugiert. Nach erfolgreicher Zentrifugation befinden sich die Immunzellen in der Interphase zwischen den beiden Percollschichten. Das Myelin lagert sich oberhalb des Gradienten ab. Diese Zellen werden mit einer 1ml Pipette vorsichtig entnommen und in ein neues 15ml Röhrchen überführt. Es ist wichtig, dabei darauf zu achten, möglichst wenig Verunreinigung durch das Myelin zu verursachen.

Das Röhrchen wird komplett mit D-MEM aufgefüllt und gut gemischt. Es folgt eine Zentrifugation bei 700g für 10 Minuten bei 4°C.

Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 10ml PBS resuspendiert und das Röhrchen bei 300g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wird ein weiteres Mal wiederholt, um das für die Zellen toxische Percoll vollständig zu entfernen. Die isolierten Immunzellen werden für die folgende Färbung in FACS-Puffer resuspendiert.

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Prinzip

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Anregung von Fluorophoren mittels Laserlicht bestimmter Wellenlängen, was zur Emission von Licht führt.

Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen einzeln aufgereiht, durch eine Kapillare gezogen und passieren dabei verschiedene Laserstrahlen. Das dabei emittierte Streulicht und, falls entsprechende Antikörper an die Zellen gebunden wurden, Fluoreszenzlicht wird nun von verschiedenen Lichtdetektoren aufgefangen.

Das Streulicht variiert bedingt durch Zellgröße, Granulationen und Struktur der Zellmembran.

Das in der Richtung des einfallenden Laserstrahls detektierte Vorwärtsstreulicht (FSC) wird durch die Beugung des Lichts hervorgerufen und korreliert mit der Zellgröße. Das im 90°-Winkel gemessene Seitwärtsstreulicht (SSC) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und steht im Zusammenhang mit der inneren Struktur der Zelle (Granulationen, Zellkerngröße). Dadurch können die Zellen bereits grob in verschiedene Gruppen unterschieden werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung verschiedener Zelltypen ergibt sich durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Zellstrukturen. Die Fluorochrome werden durch die Laser ebenfalls angeregt und emittieren Licht bestimmter Wellenlängen. Verschiedene Fluorochrome unterscheiden sich durch ihr Anregungs- und Emissionsspektrum. Durch den Einsatz verschiedenfarbiger Laser können Fluoreszenzfarbstoffe mit verschiedenen Anregungsmaxima gleichzeitig eingesetzt werden. Das von den angeregten Fluorochromen emittierte Licht wird durch die verschiedenen Spiegel und Filter spektral zerlegt und von Photo-Multiplikatoren (PMT) detektiert (Abbildung 1). Diese wandeln das ankommende

Licht in ein elektronisches Signal um, welches an den Computer zur Darstellung und Auswertung weitergegeben wird.

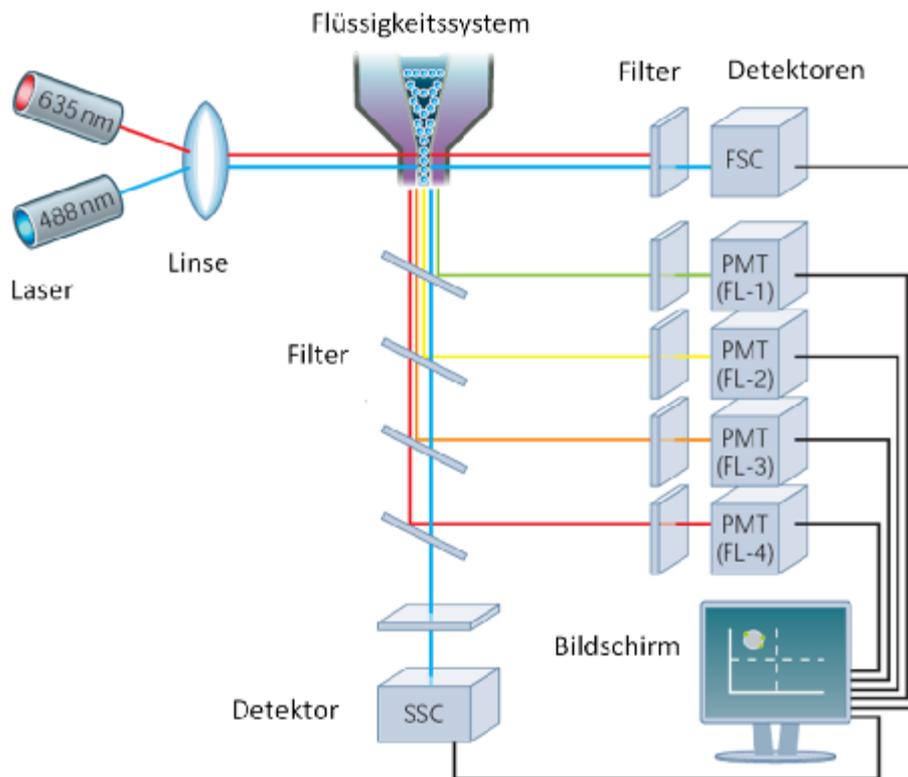


Abbildung 1: Schematische Darstellung der spektralen Detektion verschiedener Wellenlängen (Raman, 2006)

Die verwendeten Fluorochrome sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Verwendete Fluorochrome (Bioscience, 2008)

| Fluorochrom | Anregungswellenlänge | Emissionsmaximum | Detektion |
|-------------|----------------------|------------------|-------------|
| FITC | 488 nm | 519 nm | 530 ± 15 nm |
| PE | 488 nm | 578 nm | 575 ± 13 nm |
| PE-Cy5.5 | 488 nm | 693 nm | 695 ± 20 nm |
| PE-Cy7 | 488 nm | 785 nm | 780 ± 30 nm |
| PerCP-Cy5.5 | 488 nm | 696 nm | 695 ± 20 nm |
| APC | 633 nm | 660 nm | 665 ± 20 nm |
| APC-Cy7 | 633 nm | 779 nm | 780 ± 30 nm |
| PBlue | 405 nm | 455 nm | 450 ± 50 nm |

Einsatz findet diese Technik vor allem bei der Erkennung von Zelloberflächen- und intrazellulären Molekülen. Das Ziel des Einsatzes bei der EAE ist hier die

Unterscheidung verschiedener Zelltypen, sowie die Bestimmung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf diesen Zellen.

Eine quantitative Bestimmung der Zellzahl ist möglich, indem man ein bestimmtes Zellvolumen mit einer definierten Menge an fluorochromgekoppelten Kügelchen (Beads) mischt. Nach Zugabe eines Markers für Immunzellen, können nun die fluorochromgekoppelten Kügelchen bezogen auf alle Zellen gemessen werden. Da das ursprüngliche Zellvolumen, die ursprüngliche Anzahl der Kügelchen und die tatsächlich gemessene Kügelchen-Anzahl bekannt sind, kann auf die tatsächliche Anzahl lebender Zellen in der Ausgangskonzentration geschlossen werden.

2.4.2 Färbungen

Die aufgereinigten Zellen werden so in FACS-Puffer resuspendiert, dass sich ein Gesamtvolumen von 100µl ergibt. Um die Fc-Rezeptoren zu blockieren, werden Anti-CD16 / CD32 Antikörper hinzugegeben (0,3µl/ml). Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis, werden 20µl der Zellsuspension in einer 96-Lochplatte mit rundem Boden zusammen mit 20µl einer passenden Antikörpermischung inkubiert. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten bei Lagerung im Kühlschrank bei 4-8°C. Anschließend wird die Probe mit 200 µl FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (350g, 5 min, RT). Der Überstand wird verworfen und die Zellen erneut in 200µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Probe wird in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 200µl FACS-Puffer aufgefüllt. Bis zur Analyse wird die Probe auf Eis gelagert.

Zur Färbung der Zellen wurden 4 verschiedene Antikörpermischungen verwendet.

Mischung 1 dient der Aufgliederung in einzelne Zelltypen und enthält folgende Antikörper in FACS-Puffer: CD45-APC-Cy7 (20µl/ml), CD11b-FITC (7µl/ml), CD11c-APC (7µl/ml), CD4-PE (3µl/ml), CD8-Pblue (7µl/ml), B220-PE-Cy5.5 (4µl/ml), NK1.1-PE-Cy7 (14µl/ml).

Mischung 2 dient der Messung der T-Zell-Aktivierung und enthält folgende Antikörper in FACS-Puffer: CD45-APC-Cy7 (20µl/ml), CD11b-FITC (7µl/ml), CD4-PE (3µl/ml), CD8-Pblue (7µl/ml), CD25-APC (7µl/ml), CD69-PE-Cy7 (7µl/ml).

Mischung 3 dient als Negativkontrolle zur Mischung 4 und enthält folgende Antikörper in FACS-Puffer: CD45-APC-Cy7 (20µl/ml), CD11b-PerCP-Cy5.5 (7µl/ml), CD11c-PECy7 (20µl/ml).

Mischung 4 dient der Messung der Aktivierung der Antigenpräsentierenden-Zellen und enthält folgende Antikörper in FACS-Puffer: CD45-APC-Cy7 (20µl/ml), CD11b-

PerCP-Cy5.5 (7µl/ml), CD11c-PECy7 (20µl/ml), CD80-PE (20µl/ml), MHCII-FITC (20µl/ml).

Zur quantitativen Bestimmung der Zellen werden 5µl der Zellen nach der Blockierung des Fc-Rezeptors zusammen mit 85 µl FACS-Puffer und 10µl eines CD45-Antikörpers (als Marker für lebende Zellen) in ein Trucount-Röhrchen gegeben. Die Probe wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend direkt gemessen.

2.4.3 Kompensation

Unter dem Begriff Kompensation versteht man eine Software-basierte Bearbeitung der erhaltenen Fluoreszenzintensitäten, um die Eindeutigkeit der Detektion eines Fluoreszenzfarbstoffs zu gewährleisten. Diese Bearbeitung ist notwendig, da die Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome überlappen können. Im dargestellten Diagramm in Abbildung 2 überlappt das Emissionsspektrum des Fluorochroms FITC (grüne Kurve) mit dem Detektor des Fluorochroms PE (orangefeld). Dies führt zu einer nicht gewünschten Erkennung einer FITC-gefärbten Zelle im PE-Detektor. Um diesen Einfluss zu minimieren, werden alle durch Einfachfärbungen detektierten Fluoreszenzintensitäten in fremden Detektoren überprüft und die Überschneidungsbereiche abgezogen. Diese Aufgabe übernimmt in wesentlichen Zügen die Software BD FACS Diva.

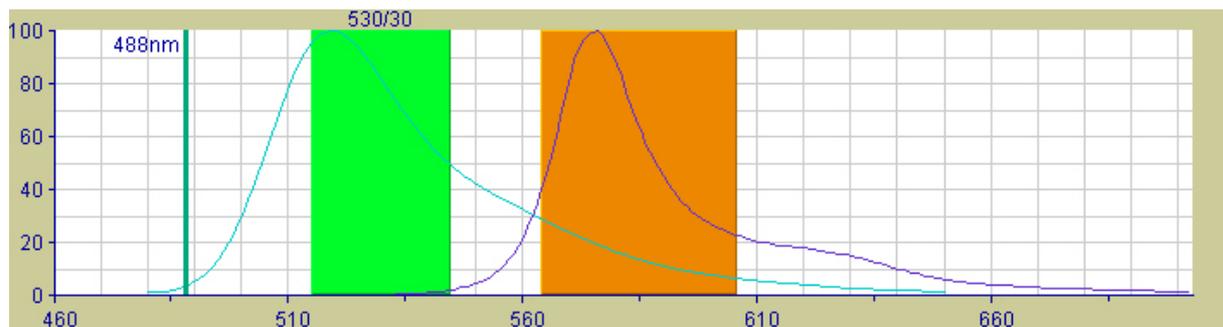


Abbildung 2: Überschneidung der Emissionsbereiche der Fluorochrome FITC und PE (Bioscience, 2008)

Zur einheitlichen Auswertung der Daten wird zunächst mit Hilfe von Einfachfärbungen eine Grundkompensation erstellt und für alle weiteren Messungen verwendet. Da die Zellausbeute der isolierten ZNS-infiltrierenden Zellen nicht für jeweils eigene Kompensationskontrollen ausreichend ist, wird die

Grundkompensation mit Hilfe von aus der Peripherie isolierten Immunzellen erstellt. Bei jeder durchflusszytometrischen Messung von ZNS-infiltrierenden Zellen werden anschließend bei der Analyse von Färbung 1, welche nur eindeutig zuzuordnende Populationen ergibt, manuell die einzelnen Detektoren gegeneinander verglichen und feinjustiert. Ziel ist es dabei, die gemessenen Populationen jeweils auf einer waagerechten Linie zu ungefärbten Zellen anzuordnen (Abbildung 3).

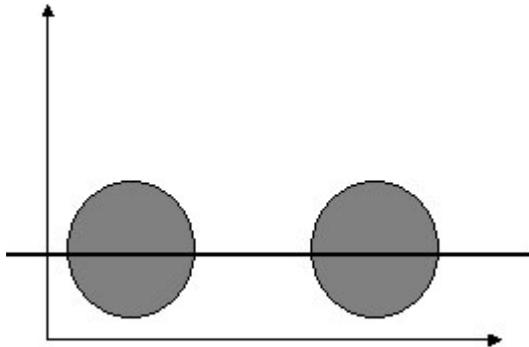


Abbildung 3: Manuelle Feinjustierung

2.5 Histologie

2.5.1 Töten der Tiere, Perfusion

Es wurde analog zu Abschnitt 2.3.1 verfahren.

Ein Unterschied besteht darin, dass das Gewebe für histologische Untersuchungen besonders gut erhalten sein muss. Die Maus wird in diesem Falle nicht mit CO₂ getötet, sondern mit 100µl Phenobarbitallösung, dies entspricht 1g/kg Körpergewicht intraperitoneal narkotisiert. Die Narkose wird unter Aufsicht des stellvertretenden Versuchsleiters durchgeführt.

Zur Perfusion verwendet man nun 4% Paraformaldehyd (PFA), ein vernetzendes Fixativ, gelöst in PBS. Der daraus resultierende Effekt ist, dass das PFA bei intaktem Herzkreislaufsystem den kompletten Kreislauf der Maus durchspült und somit das Gewebe optimal fixiert.

Nun wird wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben fortgefahren.

Das Rückenmark wird entgegen der obigen Beschreibung am Übergang zum Schädel durchtrennt und die Wirbelsäule komplett entnommen. Das Gehirn wird auf bekannte Weise entnommen und in 4% PFA über Nacht nachfixiert.

Die Wirbelsäule wird für einen Tag in PFA nachfixiert und anschließend für etwa eine Woche in einem Entkalkungspuffer gelagert. Dies führt zur Aufweichung der Knochen, sodass sich die gesamte Wirbelsäule nach Einbettung in Paraffin mit dem Mikrotom schneiden lässt. Im Gegensatz zu Cryoschnitten lassen sich in Paraffinschnitten so auch die Meningen gut darstellen.

2.5.2 Paraffinblöcke

Die Einbettung in Paraffinblöcke erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Christian Bernreuther aus der Neuropathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Das Gewebe wird in einem Korb in den Gewebereinbettautomaten gelegt und verschlossen. Der Automat durchläuft automatisch ein Programm, welches das Gewebe für 6 Minuten mit Paraffin umgibt, so dass das Gewebe anschließend fertig eingebettet vorliegt.

2.5.3 Färbungen

2.5.3.1 Entparaffinieren

Histologische Schnitte von in Paraffin eingebettetem Gewebe müssen vor den Färbungen vom Paraffin befreit werden, um das Eindringen der Farbstoffe zu ermöglichen.

Hierzu wird der Objektträger zunächst zweimal für 10 Minuten in eine Küvette mit Xylol gegeben. Anschließend wird der Träger jeweils für ca. 30 Sekunden in einer absteigenden Alkoholverdünnungsreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%) gespült. Für alkoholische Farbstoffe (z.B. Luxolechtblau) können die Schnitte nun direkt in die Färbelösung gegeben werden. Andernfalls muss der Objektträger noch für 2 Minuten in Wasser gespült werden.

2.5.3.2 Hämatoxylin-Eosin

Das Ziel der HE-Färbung ist die Darstellung der zellulären Struktur eines Gewebes. So lassen sich verschiedene Gewebestrukturen unterscheiden und auch zelluläre Infiltrate erkennen.

Der Objektträger mit dem entparaffinierten Gewebe-Schnitt wird für 5 Minuten in eine mit Hämatoxylin gefüllte Küvette gestellt und anschließend für 1,5 Minuten in eine Küvette mit Leitungswasser gegeben. Es folgt der Färbeschritt mit Eosin in einer Küvette für 30 Sekunden. Nun wird der Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 100%) gewaschen. Zum Austrocknen der Schnitte wird der

Träger kurz in eine Reihe von 3 Küvetten mit Xylolersatz gegeben. Der Objektträger wird mit einigen Tropfen Entellan benetzt und anschließend mit einem Deckglas verschlossen. Nach 20 Minuten ist das Entellan getrocknet und der Schnitt kann mikroskopiert werden.

2.5.3.3 Luxol

Die Luxol-Färbung färbt Fett an und nachdem Myelin zum größten Teil (80%) aus Fett besteht, lässt sich hiermit der Mangel oder Verlust von Myelin, d.h. die Demyelinisierung, darstellen.

Bei der Entparaffinierung wird die Alkoholreihe nur bis zum 96% Ethanol durchgeführt. Die Schnitte werden über Nacht bei 46°C mit Luxol-Lösung gefärbt. Am nächsten Tag wird die überschüssige Farbe mit 96% Ethanol ausgewaschen und anschließend in eine Küvette mit Wasser gegeben. Das Differenzieren der Färbung erfolgt durch Eintauchen in die Lithium-Lösung für 30 Sekunden und danach in 70% Ethanol für 30 Sekunden. Unter dem Mikroskop wird die Differenzierung beurteilt. Lassen sich die weiße und die graue Substanz im Schnitt nicht gut abgrenzen, werden die letzten 3 Schritte wiederholt. Andernfalls kann der Objektträger in 100% Ethanol entwässert werden und anschließend mit Xylol ausgetrocknet werden. Der Objektträger wird mit einigen Tropfen Entellan benetzt und anschließend mit einem Deckglas verschlossen.

2.5.3.4 Bielschowsky

Die Bielschowsky-Färbung ist ein Marker für die axonale Dichte eines Gewebeschnittes.

Der frisch entparaffinierte Schnitt wird zunächst gewässert und anschließend für 30 Minuten bei 37°C mit 20%iger Silbernitratlösung gefärbt. Es wird gut mit Wasser gespült. Zur Silbernitratlösung wird tropfenweise Ammoniak hinzugegeben, bis der Niederschlag verschwindet. Die Schnitte werden erneut für 30 Minuten bei 37°C in die Lösung gegeben und anschließend gespült. Zur Silberlösung werden einige Tropfen Entwickler-Lösung hinzugegeben und die Schnitte gefärbt. Tritt eine bräunliche Färbung auf, so werden die Schnitte erst in Ammoniak-Wasser und dann in Wasser gespült. Die Objektträger werden für eine Minute in 5%ige Natriumthiosulfat-Lösung gegeben und anschließend in Wasser gespült. Als letzte Schritte folgen eine aufsteigende Alkoholreihe und das Eindeckeln mit Entellan.

3 Ergebnisse

3.1 Krankheitsverlauf

Die Immunisierung der C57BL/6 Mäuse mit MOG₃₅₋₅₅ führt zu einem monophasischen Verlauf der EAE ohne komplette Remission. Die Versuchstiere wurden wie unter 2.2.2 beschrieben, immunisiert und täglich nach den Kriterien aus Tabelle 2 untersucht. Die Gruppengröße wurde auf 40 Mäuse festgelegt, um folgende Zeitpunkte mit jeweils 8 Mäusen (5 für Durchflusszytometrie und 3 für histologische Färbungen) abzudecken:

- kurz vor Beginn der ersten Symptome (Tag 9 nach Immunisierung)
- Krankheitsbeginn (Tag 1 der Krankheitssymptomatik)
- Akute Erkrankung (Tag 3 nach Krankheitsbeginn)
- Früh-chronische Krankheitsphase (Tag 10 nach Krankheitsbeginn)
- Spät-chronische Krankheitsphase (Tag 18 nach Krankheitsbeginn)

Durchschnittlich 12 Tage nach der Immunisierung setzten die ersten Symptome ein und erreichten nach weiteren 3 Tagen ihr Maximum mit einem durchschnittlichen Score von 2,7 (Abbildung 4). Das Einsetzen der Symptome ging durchschnittlich mit einem Gewichtsverlust von ursprünglich 22,7g auf 18,5g einher, der sich im weiteren Verlauf jedoch wieder normalisierte. Der Gewichtsverlust lag somit unterhalb des Abbruchkriteriums von 20% maximalem Gewichtsverlust gemäß des Tierversuchsantrages.

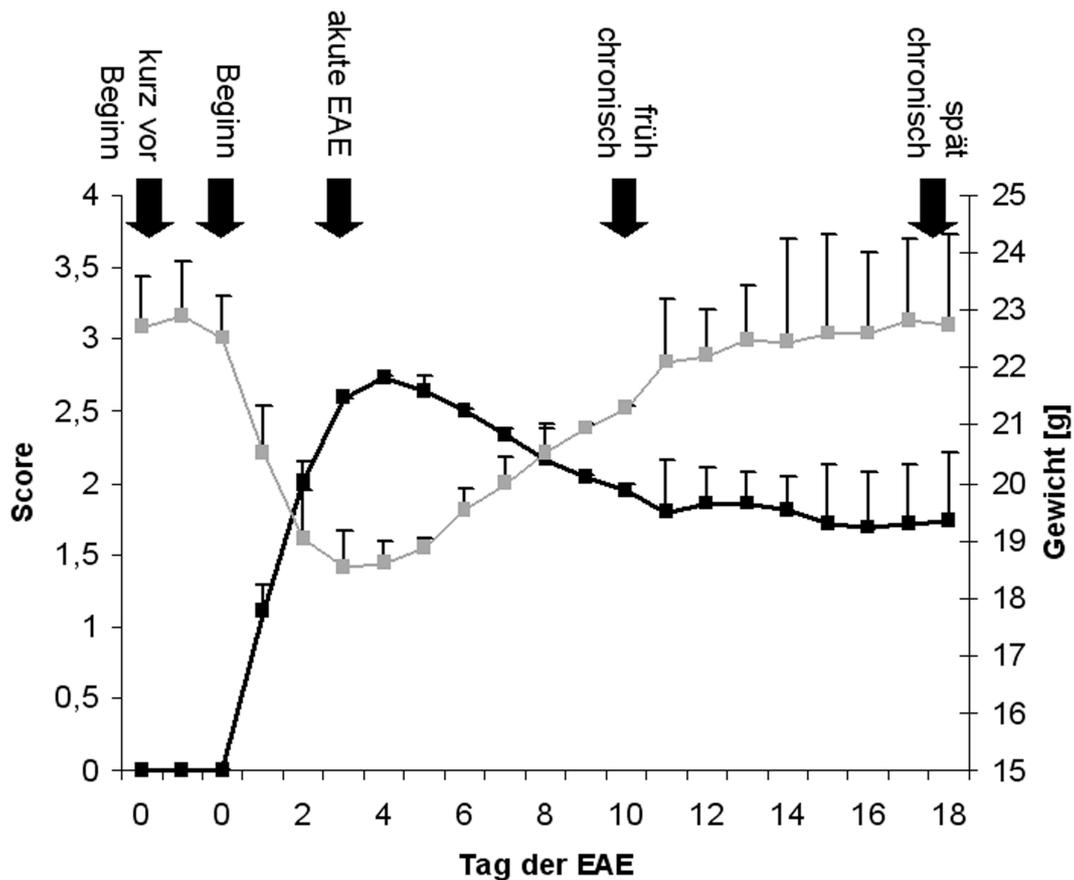


Abbildung 4: Krankheits- und Gewichtsverlauf aller behandelten Versuchstiere angegeben mit SEM (*engl.* standard error of the mean). Die einzelnen Analyse-Zeitpunkte sind mit Pfeilen markiert. n jeweils = 5

3.2 Durchflusszytometrische Identifizierung und Quantifizierung des Immunzellinfiltrates

3.2.1 Etablierung der 7-Farben-Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Messung wurden über den Percollgradienten aufgereinigte Immunzellen aus dem ZNS immunisierter Mäuse verwendet. Um ein gutes Bild vom Verlauf der Immunantwort zu erhalten, sollten möglichst viele verschiedene Zelltypen erfasst werden. Die Ausstattung des Durchflusszytometers LSR II stellte dabei den limitierenden Faktor dar. Es konnten maximal 8 verschiedene Fluorochrome in einer Messung miteinander kombiniert werden. Um eine effiziente und umfassende Zellanalyse zu erhalten, fiel die Entscheidung auf 4 verschiedene Antikörperkombinationen, die in Tabelle 4 dargestellt sind. Mit Färbung 1 ließen sich

ZNS-infiltrierende Zelltypen, wie CD4⁺, CD8⁺, NK-Zellen, Makropagen, Mikroglia, mDcs und B-Zellen erfassen. Da sich die aufgereinigten Zellen aus peripherem Gewebe, wie der Milz, unter anderem in ihrer Autofluoreszenz von den ZNS-Zellen unterscheiden, wurde diese Färbung zur Erstellung der Kompensationseinstellungen im Programm FACSDiva verwendet. Färbung 2 deckte mit den Markern CD25 und CD69 die Aktivierung der T-Zellen ab. Zur Ermittlung der Maturierung von ZNS-infiltrierenden APZ wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von MHCII und des kostimulatorischen Moleküls CD80 mit der Färbung 4 bestimmt. Es wurden dabei APZs (CD11b und CD11c) sowie CD80 und MHCII gefärbt. Die Färbung 3 diente als Negativkontrolle für Färbung 4, da APZs auch ungefärbt ein gewisses Maß an Fluoreszenz für CD80 und MHCII aufweisen. Es wurden daher nur die APZs gefärbt.

Tabelle 4: Die 4 verwendeten Färbungen mit jeweiligem Paar aus Fluorochrom und zugehöriger Zielstruktur

| |
|--|
| <p>Färbung 1 Anti-CD45-APC-Cy7, Anti-CD11b-FITC, Anti-CD11c-APC, Anti-CD4-PE, Anti-CD8-Pblue, Anti-B220-PE-Cy5.5, Anti-NK1.1-PE-Cy7</p> |
| <p>Färbung 2 Anti-CD45-APC-Cy7, Anti-CD11b-FITC, Anti-CD4-PE, Anti-CD8-Pblue, Anti-CD25-APC, Anti-CD69-PE-Cy7</p> |
| <p>Färbung 3 Anti-CD45-APC-Cy7, Anti-CD11b-PerCP-Cy5.5, Anti-CD11c-PECy7</p> |
| <p>Färbung 4 Anti-CD45-APC-Cy7, Anti-CD11b-PerCP-Cy5.5, Anti-CD11c-PECy7, Anti-CD80-PE, Anti-MHCII-FITC</p> |

3.2.2 Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen

Zur Identifizierung der Zellpopulationen wurde die Färbung 1 verwendet. Aus der isolierten Zellfraktion wurden über den Marker CD45 enthaltene Immunzellen identifiziert (Abbildung 5). Diese ließen sich aufgrund ihrer CD45 Expression in infiltrierende Immunzellen (CD45-hoch-exprimierende, CD45^{hoch}) und ZNS-residente Mikrogliazellen (CD45-intermediär-exprimierende, CD45^{int}) einteilen, welche auch CD11b exprimieren. Es wurden aus der CD45^{hoch} Fraktion die NK1.1 exprimierenden NK/NKT-Zellen (CD45^{hoch}, NK1.1⁺) separiert, da diese unter anderem CD11b, CD11c und B220 exprimieren können und somit die weiteren Messergebnisse verfälschen würden. Alle CD45^{hoch}, NK1.1⁻ Zellen wurden im nächsten Schritt nach den Markern CD11c und CD11b differenziert. So wurden die Lymphozyten (CD11b⁻, CD11c⁻),

Makrophagen ($CD11b^+$, $CD11c^-$) und myeloide dendritische Zellen ($CD11b^+$, $CD11c^+$) identifiziert. Die Lymphozyten wurden durch die Marker CD4 und CD8 in $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten separiert. Im letzten Schritt wurden mittels Marker B220 aus den $CD4^-$ $CD8^-$ Lymphozyten B-Zellen ($CD4^-$, $CD8^-$, $B220^+$) identifiziert. So konnten in einer Messung 7 verschiedene Immunzelltypen und deren Aktivierungszustand im entzündlichen Infiltrat identifiziert werden.

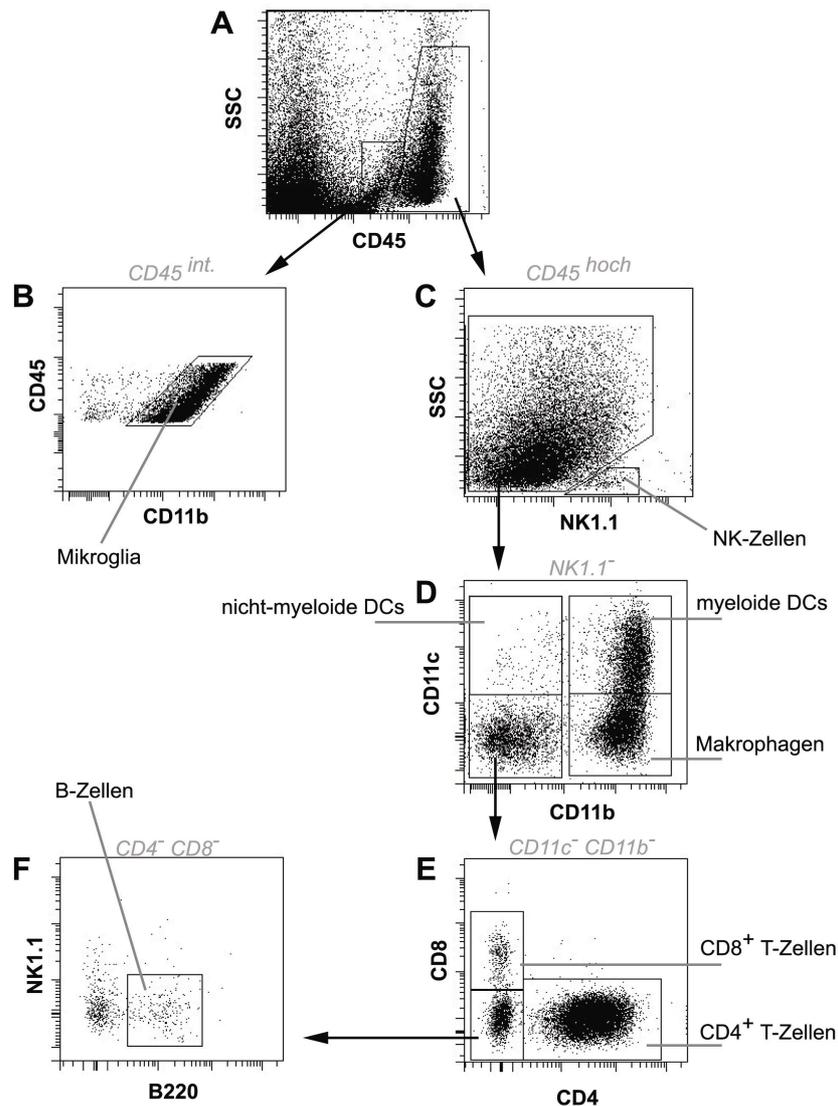


Abbildung 5: Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen. (A) Aus der isolierten Zellfraktion wurden über den Marker CD45 Immunzellen identifiziert und weiter in $CD45^{hoch}$ und $CD45^{int}$ unterschieden. (B) Aus den $CD45^{int}$ Zellen ergeben sich die Mikroglia ($CD45^{int}$, $CD11b^+$). (C) In der $CD45^{hoch}$ Population wurden die NK-Zellen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^+$) identifiziert. (D) Alle $CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$ Zellen wurden nach den Markern CD11c und CD11b unterschieden. Es wurden Lymphozyten ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^-$, $CD11c^-$), Makrophagen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^+$, $CD11c^-$), nicht-myeloide dendritische Zellen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^-$, $CD11c^+$) und myeloide dendritischen Zellen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^+$, $CD11c^+$) identifiziert. (E) Die Lymphozyten wurden weiter in CD4 ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^-$, $CD11c^-$, $CD4^+$) und CD8 Zellen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^-$, $CD11c^-$, $CD8^+$) unterteilt. (F) Ein Teil der $CD4^-$, $CD8^-$ Zellen wurde mittels Marker B220 als B-Zellen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^-$, $CD11c^-$, $CD4^-$, $CD8^-$, $B220^+$) identifiziert.

3.2.3 TruCount[®] Beads ermöglichen eine absolute Quantifizierung der ins ZNS infiltrierenden Zellen

Neben der Identifizierung der einzelnen Zelltypen war die Kenntnis der absoluten Quantität der Immunzellen im Gehirn von Interesse. Bei der durchflusszytometrischen Messung wurden dabei fluoreszierende Beads als Hilfsmittel verwendet (siehe 2.4.1), die durch ihre Größe im FSC/SSC und ihre Fluoreszenz im FACS identifiziert werden konnten (Abbildung 6 A). Durch Kenntnis der exakten Anzahl von Beads im gemessenen Röhrchen und Ermittlung des Anteils der Zellfraktion, die analysiert wurde, wurde eine Berechnung der absoluten Zellzahl ermöglicht. Die gemessene Anzahl von Beads wurde ins Verhältnis zu den gemessenen CD45^{hoch} Zellen bzw. den Mikroglia Zellen (Abbildung 6 B) und der ursprünglichen Beads-Anzahl gesetzt. Die Errechnung der absoluten Anzahl der ins ZNS infiltrierenden Immunzellen ist in (Abbildung 6 C) dargestellt.

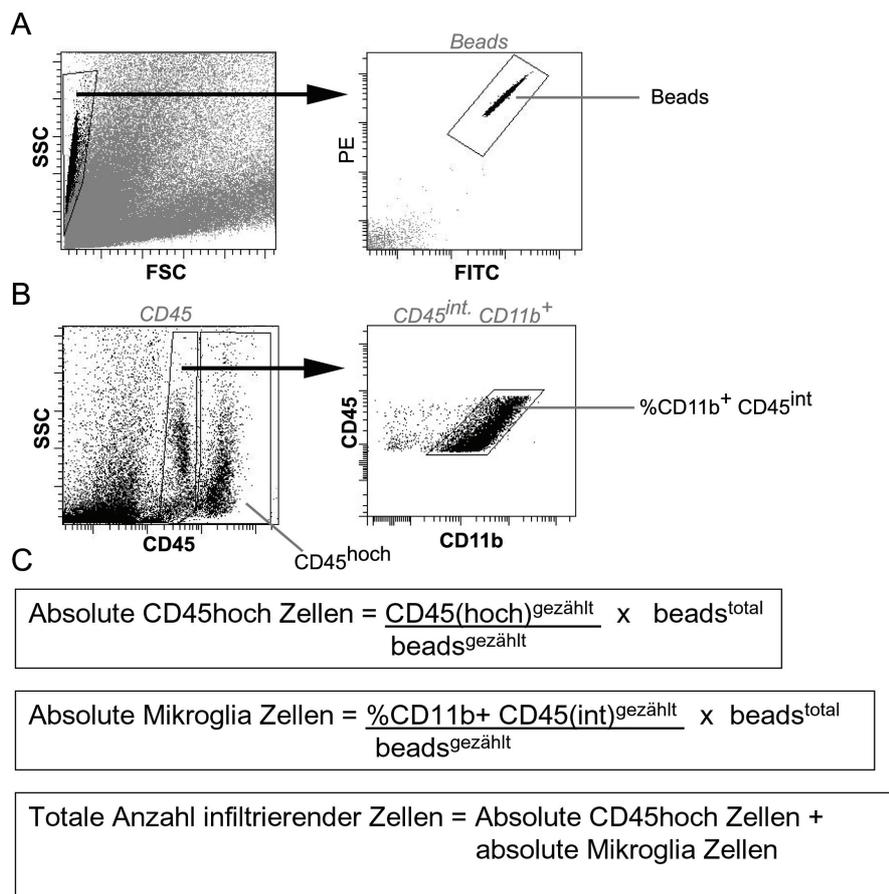


Abbildung 6: Absolute Quantifizierung der ins ZNS infiltrierenden Zellen. (A) Bei Betrachtung des FSC/SSC wurde ein grobes Gate auf die Beads gesetzt, die dann bei Darstellung der Farben PE und FITC eindeutig identifiziert werden konnten. (B) Die CD45^{hoch} Zellen und die CD11b⁺, CD45^{int} (Mikroglia) wurden, wie in Abbildung 5 dargestellt, identifiziert. (C) Die Berechnungen zeigen, wie sich von den gezählten Zellzahlen, unter Kenntnis der totalen Anzahl der Beads, auf die absolute Anzahl einer Zellpopulation bzw. auf die absolute Anzahl der ins ZNS infiltrierenden Zellen rückrechnen lässt.

3.3 Dynamik infiltrierender Immunzellen während der EAE

Durch die in 3.2.1 beschriebene durchflusszytometrische Analyse konnte der zeitliche Verlauf der Entzündungsreaktion bestimmt werden. Aus dem ZNS einer nicht-immunisierten Maus konnten im Durchschnitt 130.000 CD45⁺ Zellen (Abbildung 7) isoliert werden. Im Verlauf der EAE stieg diese Zahl deutlich an. Der größte Anstieg der CD45⁺ Zellen war zwischen dem Krankheitsbeginn mit einer Totalzellzahl von 1.000.000 und der akuten EAE mit einer Totalzellzahl von 2.450.000 nachweisbar. Die Differenz zwischen einer nicht-immunisierten Maus und dem Stadium der akuten EAE war dabei statistisch stark signifikant ($p < 0,01$). Im weiteren Verlauf der EAE reduzierte sich die Totalzellzahl wieder stark, bis im spät chronischen Stadium noch 230.000 CD45⁺ Zellen identifiziert wurden. Verglichen mit dem akuten Stadium war diese Differenz erneut statistisch signifikant ($p < 0,05$), verglichen mit einer nicht-immunisierten Maus zeigte sich jedoch keine Signifikanz.

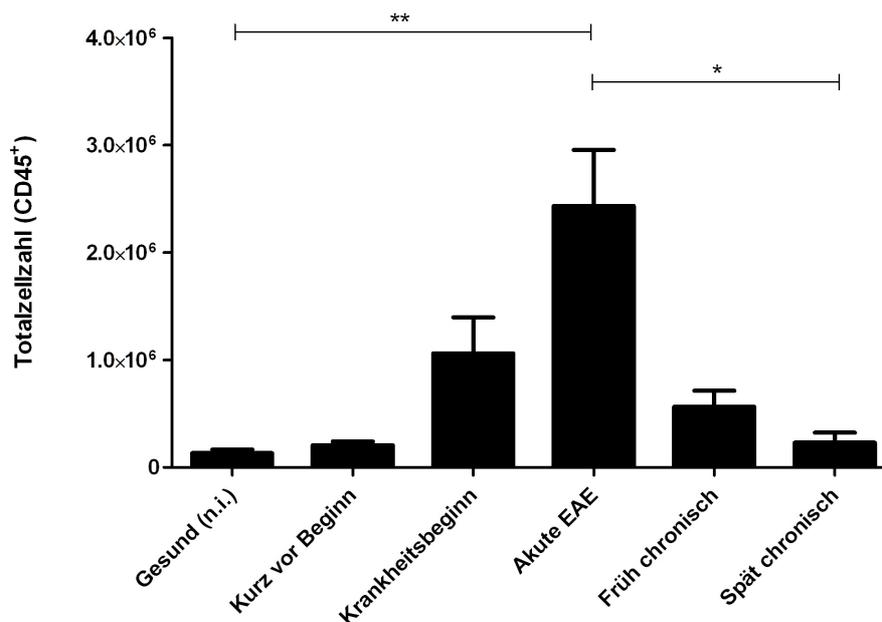


Abbildung 7: Absolute Anzahl der CD45⁺ Zellen in unterschiedlichen Stadien der EAE, n jeweils = 5, * = P-Wert 0.01 - 0.05, ** = P-Wert 0.001 - 0.01, *** = P-Wert < 0.001

Die einzelnen Zellpopulationen zeigten dabei eine unterschiedlich starke Infiltration (Abbildung 8 B-I). Am stärksten infiltrierten Makrophagen, myeloide DCs sowie CD4⁺ Lymphozyten. Unterschiede fanden sich jedoch nicht nur in der absoluten Anzahl der infiltrierenden Zellen, sondern auch in der Stärke der Infiltration. Beim direkten Vergleich der Totalzellzahl mit der Stärke der Infiltration (Differenz zur nicht-

immunisierten Maus) stellten Mikroglia mit einer Totalzellzahl von 870.000 die größte Population dar. Die Stärke der Infiltration war jedoch mit einem Faktor von 108 bei den myeloiden DCs am größten (Abbildung 8 J-K).

Die ZNS-residenten Mikroglia machten zwar mit einer Gesamtzahl von im Mittel 870.000 Zellen in der akuten EAE den größten Anteil aus, erhöhten sich verglichen mit der nicht-immunisierten Maus jedoch nur um den Faktor 11. In der spät chronischen Phase war ihre Zellzahl bereits nahezu auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt.

Eine sehr viel massivere Infiltration zeigten die myeloiden dendritischen Zellen, welche sich in der akuten EAE um den Faktor 108 auf eine Totalzellzahl von 490.000 erhöhten und selbst in der spät chronischen Phase um den Faktor 3,8 erhöht waren.

Nicht-myeloide dendritische Zellen waren in einer nicht-immunisierten Maus kaum nachweisbar (Totalzellzahl von 1.500), stiegen in der akuten EAE jedoch auf eine Totalzellzahl von 37.000 an, was einem Faktor von 24,5 entsprach. In der spät chronischen Phase war noch eine Totalzellzahl von 5.500 detektierbar (Faktor 3,7).

Die Totalzellzahl der Makrophagen stieg stark von 11.000 in einer nicht-immunisierten Maus auf 600.000 in der akuten EAE (Faktor 53,2) an. Im weiteren Verlauf reduzierte sich jedoch die Totalzellzahl wieder, so dass im spät chronischen Stadium nur noch 18.000 Zellen identifiziert werden konnten (Faktor 1,6).

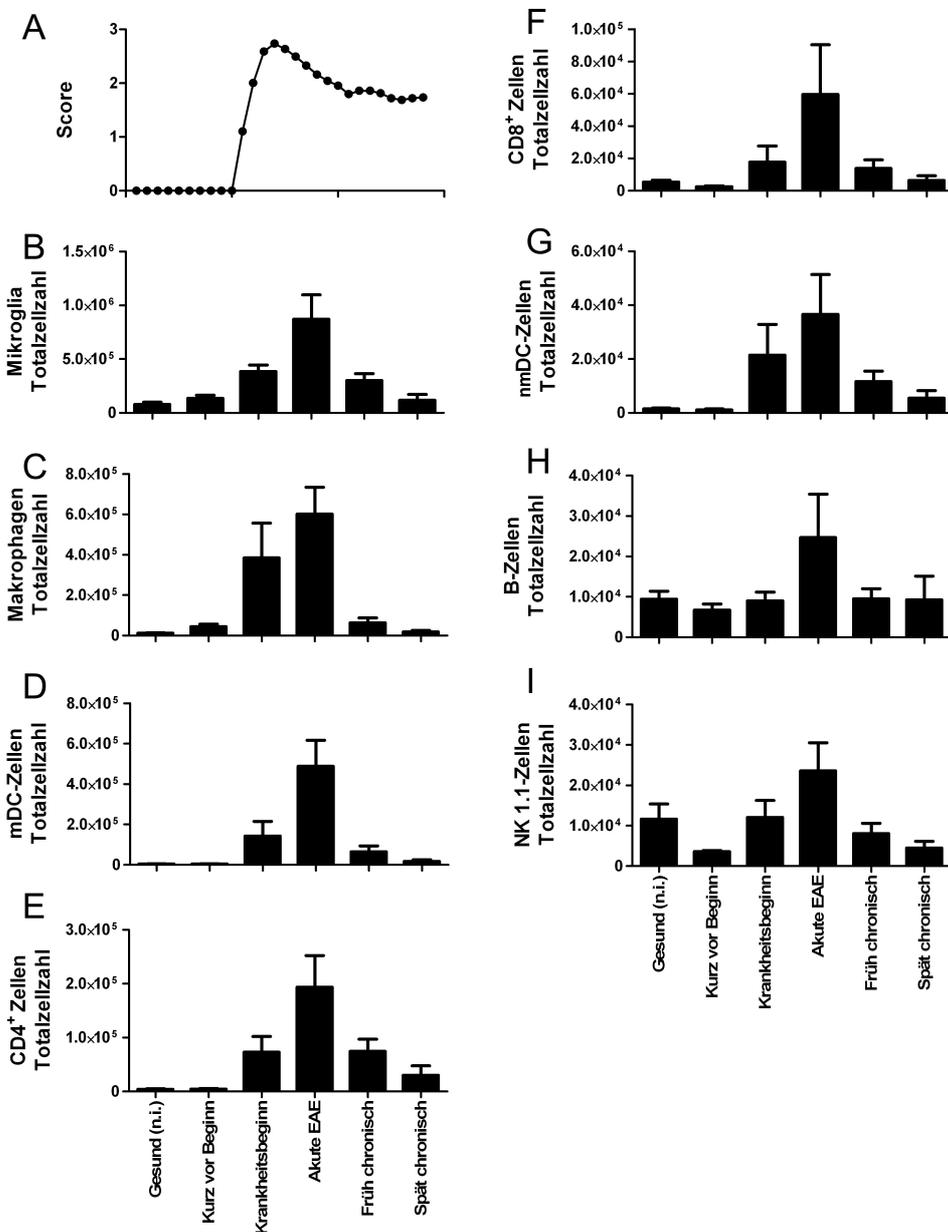
Die CD4⁺ T-Lymphozyten sind bei der Entstehung der spezifisch-vermittelten Autoimmunreaktion in der EAE von zentraler Bedeutung. Ausgehend vom Niveau einer nicht-immunisierten Maus kam es zu einer deutlichen Infiltration von CD4⁺ T-Zellen während der akuten EAE. Die Totalzellzahl stieg auf 190.000 an, was einem Faktor von 47,3 entsprach. Selbst im spät chronischen Stadium der EAE waren noch 30.000 Zellen detektierbar (Faktor 7,3).

CD8⁺ T-Zellen, deren Zytotoxizität im Rahmen des entstehenden Gewebes Schadens in der EAE immer wieder diskutiert wird, infiltrierten nur bis zu einer Totalzellzahl von 60.000 (Faktor 11,2 zur nicht-immunisierten Maus) und kehrten anschließend auf das Ausgangsniveau zurück.

B-Zellen, die im Verlauf einer Entzündung durch Differenzierung zu Plasmazellen spezifische Antikörper produzieren können, infiltrierten in geringem Maße. Einzelnen betrachtet fanden sich B-Zellen nur im ZNS von Mäusen mit einem Score >3. In einer nicht-immunisierten Maus waren 10.000 Zellen detektierbar, wohingegen in der akuten EAE insgesamt 25.000 Zellen identifiziert wurden. Dies entsprach einem

Faktor von 2,6. Bereits in der früh chronischen Phase waren die B-Zellen wieder auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt.

Die Bedeutung der NK-Zellen für den Verlauf der EAE ist nicht vollständig verstanden. Sie zeigten in unseren Messungen nach der Immunisierung zunächst ein Absinken der Totalzellzahl auf 3.600 (Faktor 0,3), die in der akuten EAE dann auf 24.000 (Faktor 2,0) anstieg. In der spät chronischen Phase betrug der Faktor zur nicht-immunisierten Maus dann 0,4, was einer Totalzellzahl von 4.500 entsprach.



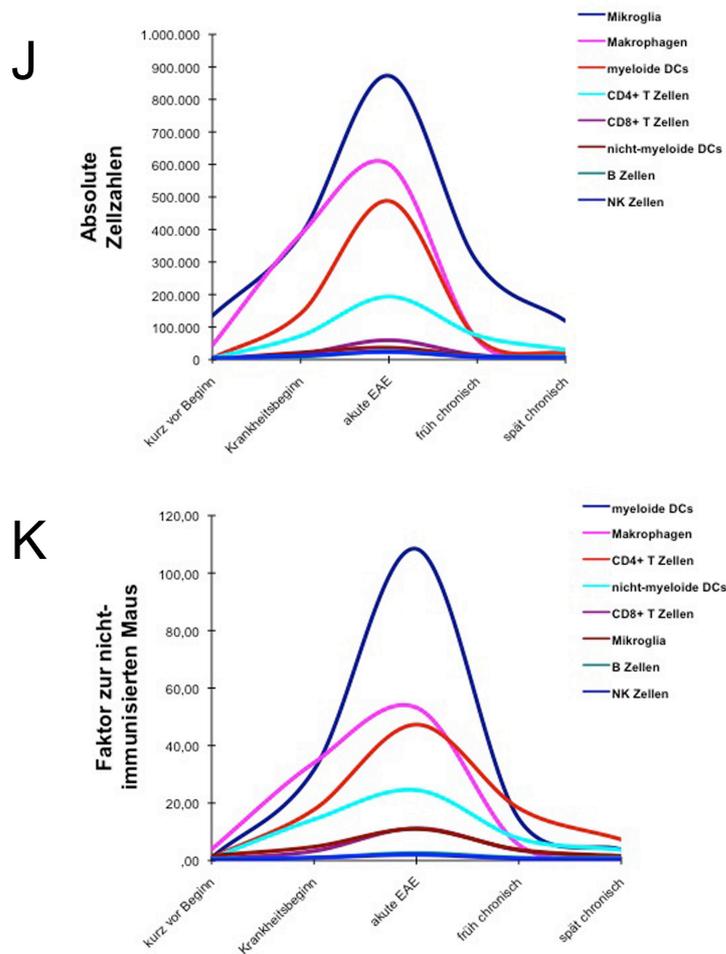


Abbildung 8: Detaillierte Übersicht der Totalzellzahlen (mit SEM) der einzelnen Zellpopulationen geordnet nach der maximalen Zellzahl, **(A)** EAE-Krankheitsverlauf der verwendeten Mäuse, **(B)** Mikroglia ($CD45^{int}$, $CD11b^+$), **(C)** Makrophagen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^+$, $CD11c^+$), **(D)** myeloide dendritische Zellen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^+$, $CD11c^+$), **(E)** $CD4^+$ ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^-$, $CD11c^+$, $CD8^-$, $CD4^+$), **(F)** $CD8^+$ ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^-$, $CD11c^+$, $CD4^-$, $CD8^+$), **(G)** nicht-myeloide dendritische Zellen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^-$, $CD11c^+$), **(H)** B-Zellen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^-$, $CD11c^+$, $CD8^-$, $CD4^+$, $B220^+$), **(I)** NK-Zellen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^+$), **(J)** Faktor der jeweiligen Zellpopulation bezogen auf die nicht-immunisierte Maus im Verlauf der EAE im Vergleich zur **(K)** absoluten Zellzahl, n jeweils = 5

3.4 Antigen-präsentierende Zellen

Für die Entstehung einer Entzündung ist eine T-Zell-Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) von entscheidender Bedeutung. Als Antigen-präsentierende Zellen werden Makrophagen, Mikroglia, B-Zellen, myeloide und nicht-myeloide dendritische Zellen zusammengefasst. Die Stimulierung der T-Zellen durch APZ erfolgt zunächst über Autoantigenerkennung durch den MHCII-Komplex. Zur vollständigen Aktivierung ist jedoch eine reife, sogenannte professionelle APZ nötig, die sich durch Zytokinfreisetzung und die Expression kostimulatorischer Moleküle

wie CD80 auszeichnet. Zur Erfassung der Reifung der APZ soll im zeitlichen Verlauf die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von MHCII und CD80 bestimmt werden.

Wie bereits unter 3.3 beschrieben, infiltrierten alle APZ in der akuten EAE in das ZNS. In der absoluten Anzahl war die Mikroglia am stärksten vertreten, wohingegen die myeloiden dendritischen Zellen mit einem Faktor von 108 bezogen auf den Wert einer nicht-immunisierten Maus relativ gesehen am stärksten infiltrierten.

3.4.1 MHCII und CD80 werden in der akuten EAE stärker exprimiert

Die Färbung der Marker CD80 und MHCII lieferte in der Regel keine bimodale Verteilung, da diese Moleküle jeweils von allen APZ exprimiert werden, ihre Expressionsstärke nach Maturierungsgrad jedoch schwankt. Zur Kontrolle der tatsächlichen Expressionsstärke wurde eine Negativfärbung durchgeführt, um die Autofluoreszenz der Marker zu erfassen (vgl. 3.2.1). Die Negativfärbung zeigte in allen Färbungen eine konstante Fluoreszenz, so dass die gemessene MFI der tatsächlichen Expression entspricht (Abbildung 9 A-C).

In einer nicht-immunisierten Maus ließ sich eine geringe Grundexpression der untersuchten Oberflächenmarker feststellen. Auf myeloiden DCs ließ sich zu diesem Zeitpunkt aufgrund zu geringer Infiltration keine Analyse vornehmen (Abbildung 9). Makrophagen, myeloide dendritische Zellen und Mikroglia zeigten in der akuten EAE eine signifikant erhöhte MFI beider Marker. Bei Makrophagen und Mikroglia sank die MFI im weiteren Verlauf der EAE wieder deutlich. Die myeloiden dendritischen Zellen zeigten jedoch bis zur spät chronischen Phase eine ansteigende MFI des Markers MHCII. Exemplarische Overlay-Diagramme für die drei Zelltypen sind in Abbildung 9 A-C dargestellt. Auf die Darstellung der nicht-myeloiden dendritischen Zellen wurde verzichtet, da sie keine signifikante Infiltration zeigten.

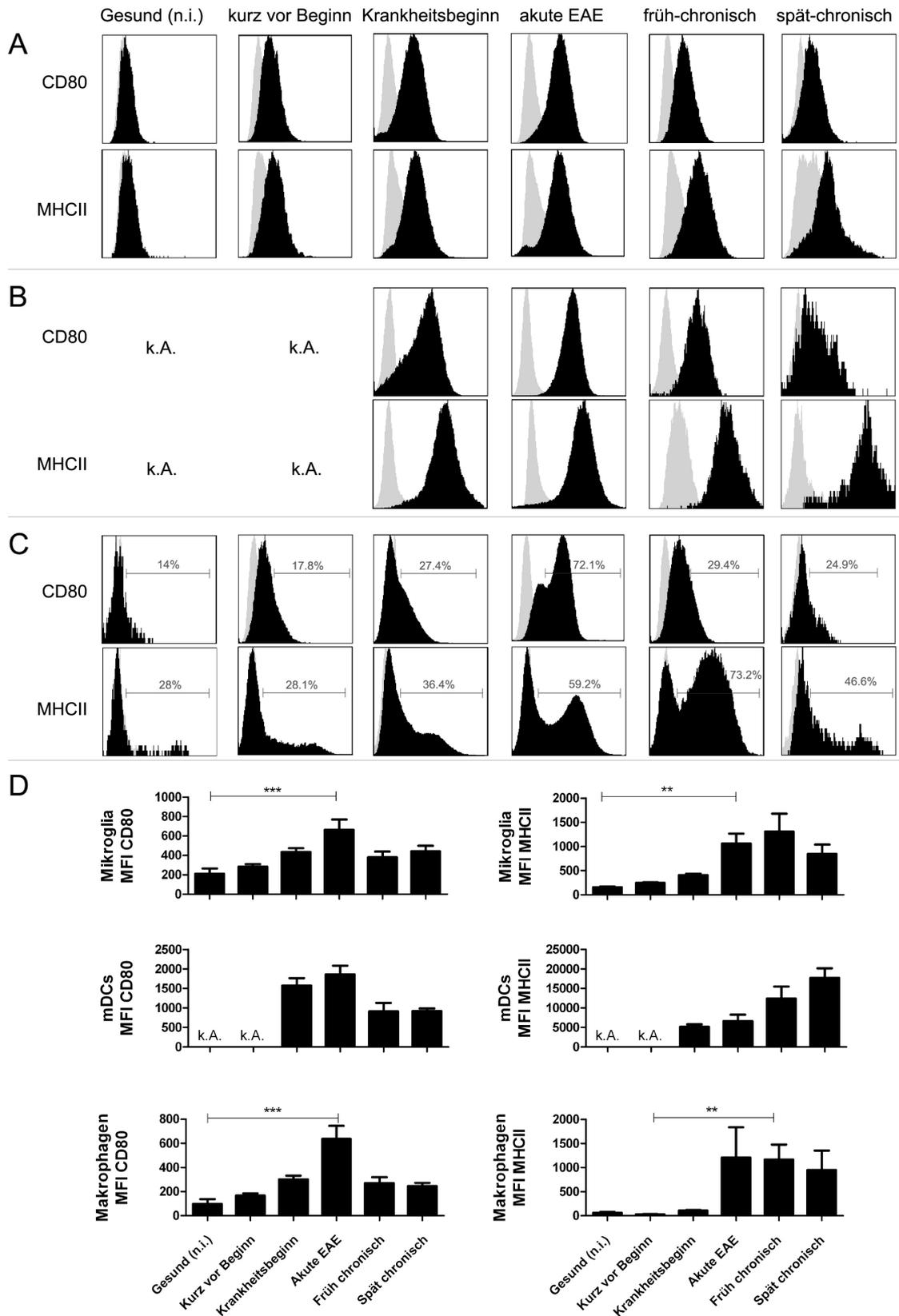


Abbildung 9: Aktivierungsstatus der antigenpräsentierenden Mikroglia ($CD45^{int}$, $CD11b^+$), myeloiden dendritischen Zellen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^+$, $CD11c^+$) und Makrophagen ($CD45^{hoch}$, $NK1.1^-$, $CD11b^+$, $CD11c^+$). (A) Overlay-Diagramme für Mikroglia mit den Markern CD80 und MHCII, (B) Overlay-Diagramme für myeloide dendritische Zellen mit den Markern CD80 und MHCII, (C) Overlay-Diagramme für Makrophagen mit den Markern CD80 und MHCII, (D) Mittlere Fluoreszenzintensität der Antigenpräsentierenden Zellen (CD80 und MHC II für Mikroglia, mDC und Makrophagen) mit SEM, n = 5, * = P-Wert 0.01 - 0.05, ** = P-Wert 0.001 - 0.01, * = P-Wert < 0.001**

3.5 T-Zell-Aktivierung

Für die Entstehung der Autoimmunreaktion in der EAE sind die CD4⁺ Lymphozyten von entscheidender Bedeutung. Es ist bekannt, dass die CD4⁺ Zellen im akuten Krankheitsschub eine entscheidende Rolle spielen, jedoch ist unklar, welcher Teil der infiltrierenden CD4⁺ Zellen in den verschiedenen Stadien der EAE aktiviert vorliegt. Um dies zu überprüfen, wurden die Lymphozyten hinsichtlich der Expression von zwei Aktivierungsmarkern untersucht. Beachtet werden muss dabei, dass auch regulatorische T-Zellen CD25⁺ sein können. Wie bereits unter 3.3 beschrieben, bilden die CD4⁺ T-Zellen die größte Population der ZNS-infiltrierenden Lymphozyten.

3.5.1 Der Anteil der CD4⁺ CD25⁺ Zellen steigt im Verlauf der EAE an

Zur Erfassung der Dynamik des Aktivierungsmarkers CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde die Färbung 2 verwendet. Neben CD45, CD11b, CD4 und CD8 enthielt sie die Marker CD25 und CD69. Auf die Darstellung der CD69⁺ Zellen wird verzichtet, da sich keine signifikante Expression des Markers zeigte.

Aus der isolierten Zellfraktion wurden über den Marker CD45 und die SSC/FSC CD45⁺ Immunzellen identifiziert (Abbildung 10 A). Aus dieser Population wurden die Lymphozyten (CD45⁺, CD11b⁻) aufgrund ihrer fehlenden CD11b Expression identifiziert. Mittels der Marker CD4 und CD8 wurden CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten separiert. Die CD25⁺ Zellen wurden jeweils im Bezug auf die Färbung 1 als Negativkontrolle bestimmt.

Bei Betrachtung der Totalzellzahl der CD4⁺ CD25⁺ und der CD8⁺ CD25⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf der Krankheit (Abbildung 10 C) zeigte sich ein deutlicher Anstieg von einer gesunden zu einer akut erkrankten Maus. Bei beiden Zellpopulationen kam es anschließend zu einem Abfall der Zellzahl. Hierbei erreichten jedoch nur die CD8⁺ CD25⁺ T-Zellen wieder das Ausgangsniveau. Es waren beim letzten Messpunkt immer noch knapp 8.000 CD4⁺ CD25⁺ Zellen nachweisbar, was einem Faktor von 47 zur gesunden Maus entsprach. Dieser Verlauf entsprach bezüglich der Dynamik in etwa dem Verlauf der gesamten CD4⁺ bzw. CD8⁺ Population.

Nach Errechnung des Prozentanteiles der CD25⁺ Zellen an der Gesamtpopulation zeigte sich jedoch ein anderer Verlauf (Abbildung 10 D). Im Verlauf der EAE stieg der Anteil der CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen an der Gesamtpopulation der CD4⁺ T-Zellen immer weiter an. So steigerte sich der Wert von anfänglich ca. 5% auf ca. 22% in der spät chronischen Phase.

Der Anteil der CD8⁺ CD25⁺ T-Zellen an den Gesamt CD8⁺ T-Zellen variierte nur um wenige Prozentpunkte und fiel nach einem Anstieg bis zur akuten EAE sogar unter den Ausgangswert ab. Es zeigten sich insgesamt kaum aktivierte CD8⁺ Zellen.

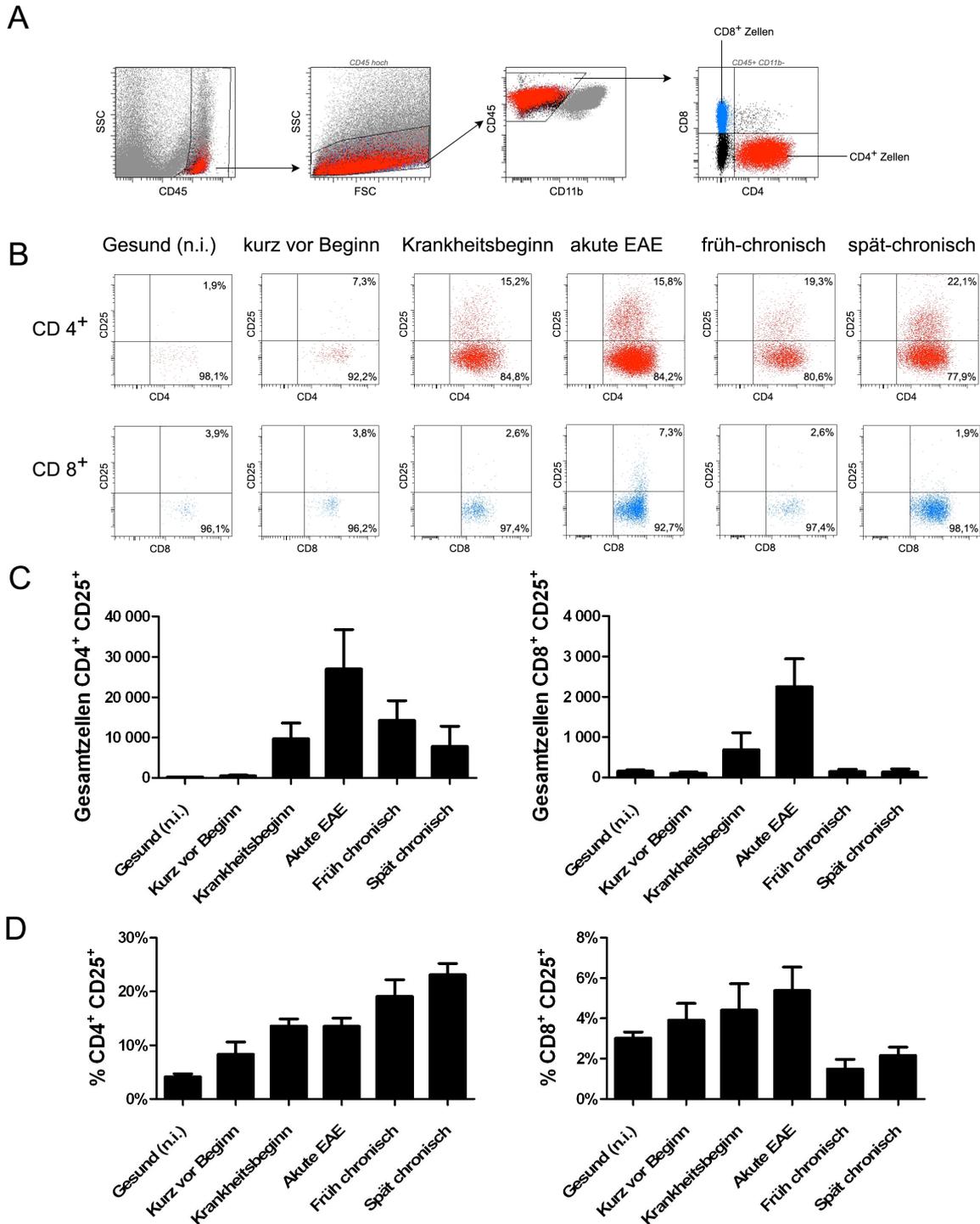


Abbildung 10: (A) Identifikation der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen: Aus der isolierten Zellfraktion wurden über den Marker CD45 und die SSC/FSC CD45 enthaltende Immunzellen identifiziert. Aus dieser Population wurden die Lymphozyten (CD45⁺, CD11b⁻) aufgrund ihrer fehlenden CD11b Expression identifiziert. Mittels der Marker CD4 und CD8 konnten CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten separiert werden. **(B) Repräsentative Punktdiagramme der CD8⁺ CD25⁺ und CD4⁺ CD25⁺ Zellen zu allen gemessenen Zeitpunkten mit Prozentzahl der jeweiligen Population;** **(C) Gesamtzahlen der CD25 positiven CD8⁺ bzw. CD4⁺ Zellen und (D) durchschnittliche Prozentzahlen der CD25⁺ CD8⁺ bzw. CD4⁺ Zellen**

3.6 Natürliche Killer-Zellen

Wie in der Einleitung beschrieben, unterscheidet man verschiedene NK-Zell-Subtypen aufgrund ihrer Zytokinproduktion und ihrer Zytotoxizität. Die Bedeutung der NK-Zellen in EAE und MS ist in weiten Teilen noch unklar. Um die Reifung der NK-Zellen während der EAE zu erfassen, wurden die Oberflächenmarker CD11b, CD11c und B220 verwendet. Man vermutet, dass diese Marker bei der Maturierung zu einzelnen NK-Subtypen eine wichtige Rolle spielen (Vosshenrich et al., 2007).

Zunächst wurden alle $CD45^{\text{hoch}}$, $NK1.1^+$ Zellen anhand der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 in NK-Zellen und NKT-Zellen differenziert. Sowohl NK-, als auch NKT-Zellen wurden dann weiter hinsichtlich einer Expression der Oberflächenmarker CD11b, CD11c und B220 untersucht.

3.6.1 NK-Zellen bilden den größten Anteil an $NK1.1^+$ Zellen

Als NK-Zellen wurden alle $NK1.1^+$ Zellen bestimmt, die $CD4^-$ und $CD8^-$ waren. Alle $CD4^+$ und $CD8^+$ $NK1.1^+$ Zellen wurden als NKT-Zellen benannt. Abbildung 11 zeigt die Totalzellzahl für NK- und NKT-Zellen. Die Summe beider Zahlen ergibt alle $NK1.1^+$ Zellen. Direkt nach der Immunisierung kam es zu einem Abfall der $NK1.1^+$ Zellen, gefolgt von einem Anstieg bis zur akuten EAE. In der chronischen Phase lag die Totalzellzahl unter dem Ausgangsniveau. Es wurde deutlich, dass die NK-Zellen den größten Anteil an $NK1.1^+$ Zellen bilden und im Wesentlichen für die NK-Zell-Dynamik verantwortlich sind.

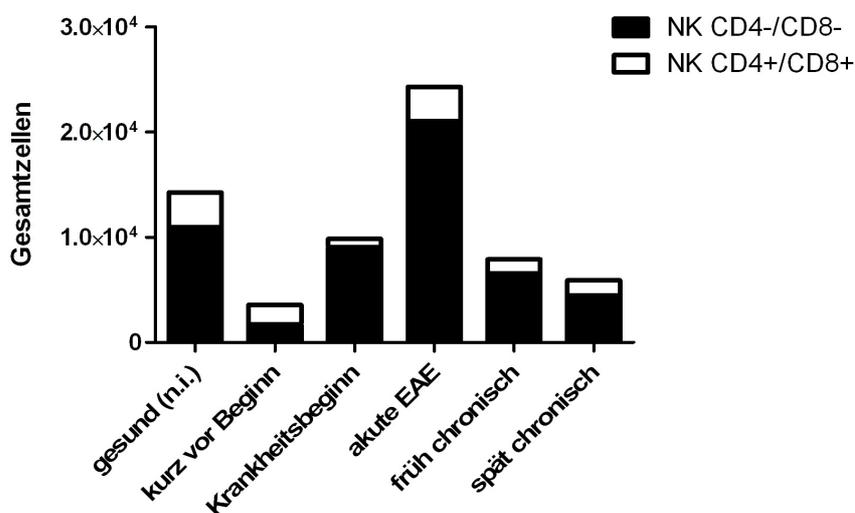


Abbildung 11: Absolute Zellzahlen von $NK CD4^-/CD8^-$ und $NK CD4^+/CD8^+$ Zellen mit SEM

3.6.2 ZNS-infiltrierende NK-Zellen und NKT-Zellen zeigen unterschiedliche Oberflächenexpression der Marker CD11b, CD11c und B220

Bei Betrachtung der oben genannten Oberflächenmarker im zeitlichen Verlauf zeigte sich eine starke Dynamik, sowie deutliche Unterschiede zwischen NK- und NKT-Zellen (siehe Abbildung 12).

Auf den NK-Zellen war im gesamten EAE-Verlauf nur in minimalem Ausmaß (max. Median von 259) der Marker B220 nachweisbar. In einer nicht-immunisierten Maus waren die Marker CD11b und CD11c nahezu ausgeglichen. Dies änderte sich in der akuten EAE durch eine Verdoppelung des Medians von CD11b sowie einer Reduktion des Markers CD11c um ca. 40%. In der spät chronischen Phase kehrte sich dieses Verhältnis jedoch um, sodass nun der Median von CD11c bezogen auf den Ausgangswert verdreifacht war. Der Median für CD11b lag nahezu auf Ausgangsniveau.

Auf den NKT-Zellen waren alle gemessenen Marker deutlicher höher nachweisbar, als auf NK-Zellen, wobei B220 mit einem Median von 5.500 dominierte. Mit Einsetzen der Symptome kam es bei allen Markern zu einem massiven Abfall der Expression, um in der frühen chronischen Phase dann aber erneut zu steigen. So war B220 wieder mit einem Median von 3.500 messbar. In der späten chronischen Phase kehrten CD11b und CD11c auf ihr Ausgangsniveau zurück, wohingegen B220 mit einem Median von 3.800 um 30% reduziert war.

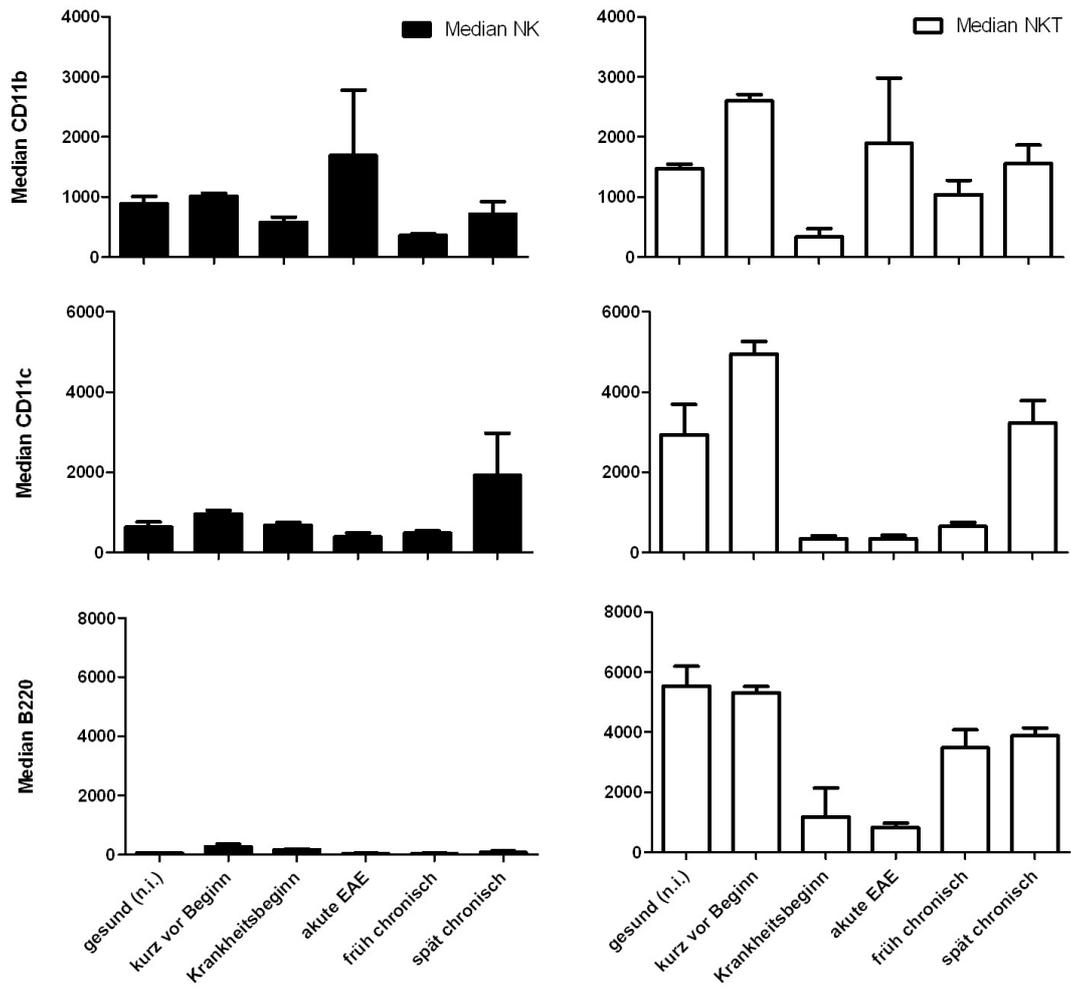


Abbildung 12: Median der Marker CD11b, CD11c, B220 von NK- ($CD45^{\text{hoch}}$, $NK1.1^+$, $CD4^-$, $CD8^-$) und NKT-Zellen ($CD45^{\text{hoch}}$, $NK1.1^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) mit SEM

3.7 Histologie

Ziel der histologischen Untersuchungen war die Verifizierung der durchflusszytometrischen Ergebnisse. Dafür wurden, wie unter 2.5 beschrieben, Schnitte des zervikalen Rückenmarks und des Gehirns der Mäuse angefertigt und mit den Färbungen H.E. (Zellkerne und Zellplasmaproteine), Luxol (Myelin), CD3 (Lymphozyten), B220 (B-Zellen) und iba1 (Makrophagen) gefärbt. Es zeigte sich, dass der Schwerpunkt der Entzündung im Rückenmark lokalisiert war und im Gehirn selbst kaum Entzündungsaktivität nachweisbar war. Im Folgenden wird daher nur auf das zervikale Rückenmark eingegangen. Abbildung 13 zeigt die fotografierten Schnitte einer nicht-immunisierten Maus, sowie an Tag 0, 3 und 18 im Verlauf der EAE.

Verglichen mit der gesunden Maus zeigen sich in allen drei weiteren Mäusen in der H.E. Färbung deutliche Läsionen des Rückenmarks. Betrachtet man diese Läsionen in der Luxolfärbung, so zeigt sich eine deutliche Aufhellung, was einer Demyelinisierung entspricht. Die Färbung für CD3 zeigt zum Krankheitsbeginn und in der akuten EAE eine deutliche Zellanreicherung, die jedoch in der spät chronischen Phase weitestgehend verschwunden ist. Die iba1 Färbung liefert ebenfalls das Bild einer Makrophageninfiltration in den akuten Stadien, die im weiteren Verlauf rückläufig ist. Die B220 Färbung war nur in manchen Mäusen nachweisbar, was dem Ergebnis der FACS Messung entspricht.

Zusammenfassend zeigte sich eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen der Histologie und jenen der FACS-Analyse.

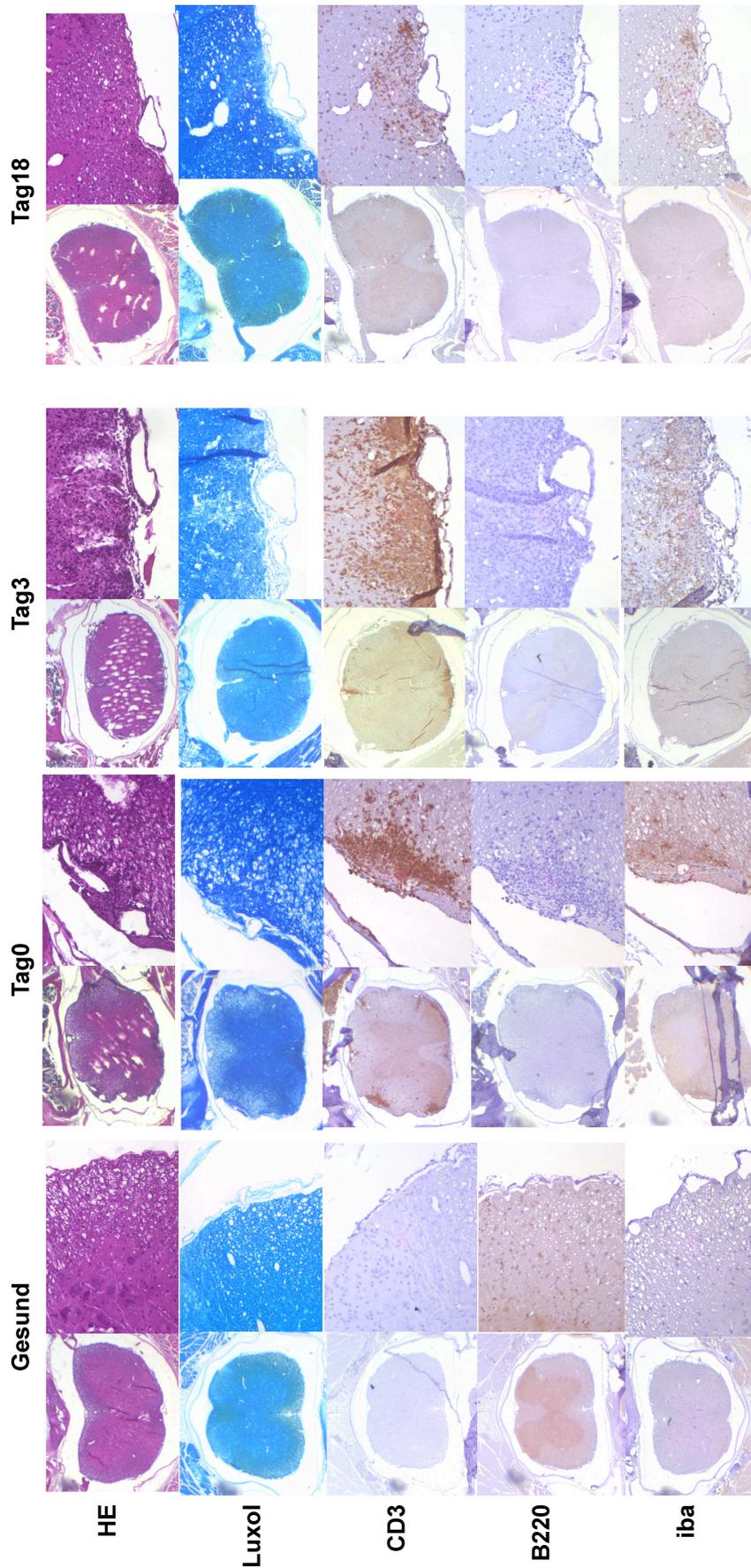


Abbildung 13: Histologische Färbung von zervikalem Rückenmark in 3 Stadien und 5 Färbungen. Wir sehen eine gesunde, eine neu erkrankte, eine akut erkrankte und eine spät chronisch kranke Maus. Die Schnitte wurden mit H.E., Luxol, CD3, B220 und iba1 gefärbt. Neben einer Übersichtsaufnahme des Rückenmarkes befindet sich rechts eine Vergrößerung einer Läsion.

4 Diskussion

4.1 Die 7-Farben Durchflusszytometrie ermöglicht eine umfassende Analyse der ins ZNS-infiltrierenden Immunzellen

In dieser Arbeit wurde zunächst ein durchflusszytometrisches Analyseverfahren entwickelt, mit welchem möglichst viele Immunzellpopulationen erfasst und charakterisiert werden können.

Um ein umfassendes Bild der infiltrierenden Immunzellen zu erhalten, wurde eine 7-Farben Durchflusszytometrie verwendet, mit welcher Mikroglia, NK-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen (myeloide und nicht-myeloide), CD4⁺ Zellen, CD8⁺ Zellen und B-Zellen nachgewiesen wurden. Die zeitgleiche Verwendung von TruCount[®] Beads in einer eigenen Färbung ermöglichte zusätzlich eine genaue Bestimmung der absoluten Zellzahl jeder Zellpopulation. Somit ergab sich ein breites Bild der Dynamik der unterschiedlichen, infiltrierenden Immunzellen, auf deren Ergebnisse in den folgenden Abschnitten eingegangen werden soll.

Der wesentliche Vorteil der verwendeten Methodik besteht darin, dass mit einer sehr sensitiven Messung umfassende Informationen über die Zusammensetzung des Immunzellinfiltrats gewonnen werden können. Bisherige Charakterisierungen der EAE fokussierten sich auf Teilaspekte wie CD8⁺ T-Zellen, Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle oder untersuchten das Zellinfiltrat rein qualitativ mit besonderem Fokus auf einzelne Zellpopulationen (Rigolio et al., 2008, Schneider et al., 2009, Zhang et al., 2004, Deb and Howe, 2009). Die von Chandra Deb durchgeführte Arbeit war bislang die einzige, welche mehr als sechs verschiedene Antikörper in einer FACS-Färbung kombinierte. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Quantifizierung der infiltrierenden Immunzellen mittels TruCount[®] Beads wurde in der EAE noch nicht durchgeführt und ermöglicht es erstmals die einzelnen Zellpopulationen in ihrer absoluten Anzahl direkt zu vergleichen. Besonders zu Krankheitsbeginn wiesen die Ergebnisse teilweise hohe Standardabweichungen auf, was wahrscheinlich im Wesentlichen auf den heterogenen zeitlichen Verlauf der EAE zurückzuführen ist. Die durchgeführten Signifikanztests zeigten jedoch vor allem beim Vergleich einer gesunden zu einer akut erkrankten Maus signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert von < 0,05 oder niedriger.

Parallel zur durchflusszytometrischen Analyse wurden histologische Färbungen (H.E., Luxol, CD3, iba, B220) des ZNS und Rückenmarks der immunisierten Mäuse erstellt. Hier konnte das Auftreten von Läsionen in erkrankenden Mäusen sowie eine Reduktion ihrer Größe im Verlauf der Krankheit nachgewiesen werden. Der wesentliche Vorteil der histologischen Färbung besteht in der Möglichkeit der Lokalisierung. Wie bereits in vielen anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (Herrero-Herranz et al., 2008, Wu et al., 2008), so konnte auch diese Arbeit bestätigen, dass sich der größte Teil der Läsionen im zervikalen Rückenmark und nicht im Gehirn selbst befanden. Ebenfalls ist es möglich zu unterscheiden, ob das Infiltrat perivaskulär und im Hirnparenchym lokalisiert ist. Ein Nachteil der Histologie ist die ungenaue Quantifizierung und die geringe Spezifität der Färbung.

In Kombination mit einer histologischen Analyse zur Lokalisation und Bestimmung des Ausmaßes der perivaskulären Infiltration ermöglicht das in dieser Arbeit entwickelte durchflusszytometrische Verfahren eine schnelle Analyse der beteiligten Immunpopulationen und ihrer Phänotypen sowie eine schnelle Identifikation von immunologischen Veränderungen in genetisch-manipulierten oder medikamentös behandelten Krankheitsmodellen.

4.2 Das Immunzellinfiltrat

Die durchflusszytometrischen Messungen während der EAE lieferten ein umfassendes Bild der dynamischen Entwicklung vieler Immunzellpopulationen. Bei Vergleich von Krankheitsverlauf und Gesamtzellzahl wurde eine eindeutige Korrelation festgestellt. Direkt bei Einsetzen der ersten Symptome kam es zu einem Anstieg der Gesamtzellzahl, welche zum Zeitpunkt des maximalen Krankheitscores ebenfalls ihr Maximum von durchschnittlich 2.450.000 Zellen erreichte. Von den identifizierten Zellen bildeten die Antigen-präsentierenden Zellen mit Abstand die größte Population. So konnten Mikroglia, Makrophagen und myeloide dendritische Zellen als die drei größten Zellpopulationen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse entsprechen jenen, die Zhang bei seinen Untersuchungen zur T-Zell- und Antikörper-Reaktion in der EAE beschrieb (Zhang et al., 2004). Diese Antigen-präsentierenden Zellen produzieren unter anderem inflammatorische, potentiell oligo- und neurotoxische Zytokine und Mediatoren wie zum Beispiel TNF- α und reaktive Sauerstoffspezies, wie beispielweise das durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS)

synthetisierte NO-Radikal, welche zur Myelin-Schädigung in der akuten Phase der EAE beitragen (Miller et al., 2007, Dhib-Jalbut, 2007).

Neben der Infiltration der Antigen-präsentierenden Zellen stellten CD4⁺ T-Zellen die größte Zellpopulation dar. Wie in der Einleitung beschrieben, differenzieren CD4⁺ Zellen je nach vorherrschendem Zytokinmilieu weiter in verschiedene Subtypen. Neben den T_{H1} und den T_{H17} Zellen, spielen regulatorische (T_{reg}) und Effektor T-Zellen (T_{eff}) in der EAE eine wichtige Rolle. Sowohl T_{reg} als auch T_{eff} Zellen zeigen eine CD4⁺ CD25⁺ Expression, weshalb eine Differenzierung zwischen den Beiden in dieser Arbeit nicht möglich war. Jinzhu Li (Li et al., 2007) konnte mit seiner Arbeitsgruppe CD4⁺ CD25⁺ Zellen aufgrund der Höhe ihrer CD4 Expression in regulatorische und zytotoxische T-Zellen differenzieren. Diese Aufteilung war mit den vorliegenden Daten nicht möglich, da keine zwei getrennten Populationen identifiziert werden konnten.

Der Prozentsatz der CD25⁺ T-Zellen stieg bis zum spät chronischen Stadium konstant an, was für ihr Verbleiben im ZNS spricht. Unklar bleibt jedoch, ob es sich dabei um T_{reg} oder um T_{eff} Zellen handelt. Es wäre zu erwarten, dass regulatorische T-Zellen durch Inhibition der Immunantwort zu einem Abklingen der Symptome führen würden, wohingegen Effektor T-Zellen durch Zytokin-Sekretion von insbesondere IL-6 und TNF α auch in der chronischen Phase einen Schaden verursachen könnten. Thomas Korn konnte in seinen Untersuchungen zeigen, dass T_{reg} nach der akuten Phase im ZNS bleiben, wohingegen die Zahl der T_{eff} deutlich rückläufig war (Korn et al., 2007). Dennoch konnten die T_{reg} die aktivierten T_{eff} im entzündeten ZNS nicht supprimieren, was er auf deren Sekretion der Zytokine IL-6 und TNF α zurückführte. Zur Weiterführung dieser Arbeit wäre zur weiteren Differenzierung der CD25⁺ Population eine FoxP3 Färbung sowie eine Bestimmung der Zytokin-Expression (u.a. IL-6, IL-17, IFN- γ und TNF α) nötig. Erst dann wäre eine genauere Aussage über die Funktion der CD4⁺ Zellpopulation möglich. Es wäre zu erwarten, dass die Population der FoxP3⁺ T_{reg} Zellen im Verlauf der EAE größenkonstant bleibt, diese in der chronischen Phase jedoch keinen weiteren Effekt auf die bereits aktivierten T_{eff} Zellen haben, zumal der klinische Score nach dem akuten Schub der EAE konstant blieb. Das verbleibende irreversible Restdefizit der Tiere dürfte insgesamt sowohl durch das chronische Entzündungsinfiltrat, als auch durch einen axonalen Schaden bedingt sein (Bitsch et al., 2000, Trapp et al., 1998, Wujek et al., 2002).

4.3 APZ infiltrieren in der akuten EAE und werden stark aktiviert

Antigen-präsentierende Zellen spielen in der angeborenen, aber auch in der adaptiven Immunabwehr eine wichtige Rolle. Sie erkennen über PAMP-Rezeptoren Fremdantigene und nehmen diese auf, um sie den T-Zellen über den MHC II Komplex zu präsentieren. Zur vollen Aktivierung der T-Zellen ist eine reife APZ nötig, die sich durch eine Reihe von Reifungsmarkern, besonders aber durch MHC II Expression sowie durch Zytokinsekretion auszeichnet. Es folgt die spezifische Immunabwehr gegen das Fremdantigen durch die T-Zellen. Die Infiltration der APZ in das ZNS erfolgt durch Mobilisierung von Monozyten aus dem peripheren Blut über die Bluthirnschranke, wo eine weitere Differenzierung in Makrophagen und dendritische Zellen erfolgt (King et al., 2009). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Bedeutung der APZ-Aktivität im ZNS in der chronischen Phase der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE.

Die Antigen-präsentierenden Zellen waren im akuten Stadium der EAE die am stärksten vertretene Zellpopulation. Mikroglia und Makrophagen waren bereits in einer gesunden Maus nachweisbar, zeigten in der akuten EAE jedoch eine massive Infiltration ins ZNS. Myeloide dendritische Zellen konnten im ZNS in der akuten EAE erstmalig nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse passen gut zu Muster I der von Lassmann beschriebenen pathophysiologischen Muster. Es besagt, dass der tatsächliche Schaden am Myelin auf die T-Zell-vermittelte Aktivierung der APZ zurückzuführen sei (Lassmann et al., 2001).

Neben der zahlenmäßigen Verteilung der verschiedenen APZ war ihr Aktivierungsgrad von Interesse. Hierzu wurde die Expression von MHC II und CD80 auf den APZ bestimmt, um dadurch auf den Reifungsgrad schließen zu können. In der akuten Phase der EAE zeigte sich eine signifikante Steigerung der mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD80 und MHC II auf Mikroglia und Makrophagen (p bis zu $<0,001$). MHC II exprimierende Makrophagen entsprechen zum größeren Teil so genannten M1-Makrophagen, die Sauerstoffradikale und iNOS freisetzen (Gordon and Martinez, 2010). Die massive Infiltration der APZ sowie die Hochregulation von MHCII sprechen somit für eine Schädigung des Myelins und der Neurone in der akuten Phase der EAE.

Die MFI des CD80 auf den mDC sowie MHCII und CD80 auf Mikroglia und Makrophagen fielen nach der akuten Phase wieder deutlich ab. Die MFI des MHCII auf den myeloiden dendritischen Zellen hingegen stieg bis in das späte chronische

Stadium an. Viele Arbeiten konnten zeigen, dass dendritische Zellen, insbesondere mDCs für die T-Zell-Aktivierung in der akuten EAE unabdingbar sind (Miller et al., 2007, Serafini et al., 2006). Die Arbeitsgruppe von Stephen Miller untersuchte die Funktion der myeloiden APZ in der relapsing-remitting EAE und konnte auch in späteren Schüben die Notwendigkeit der Co-Stimulation nachweisen (Schreiner et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmalig die Aktivierung der APZ in der chronischen EAE untersucht. Interessanterweise waren in der chronischen Phase die verbliebenen mDCs weiter steigend positiv für MHCII und sind somit als aktiviert anzusehen. Dies spricht dafür, dass die Zellen weiterhin stimuliert und somit aktiv gehalten werden. MHC II positive APZ wiederum könnten dann auch in der chronischen Phase T-Zellen aktivieren und somit einen späteren Schub auslösen bzw. chronische Entzündungsmechanismen unterhalten.

Man kann zusammenfassen, dass APZ in der initialen Phase der EAE sowohl eine entscheidende Bedeutung als Co-Aktivatoren der T-Zellen haben, selbst jedoch auch durch Freisetzung von zytotoxischen Substanzen zu einer Myelinschädigung führen. In der chronischen Phase bleiben vor allem mDCs aktiviert, die einen wichtigen Kofaktor zur Entwicklung eines Schubs oder der Chronifizierung der Erkrankung darstellen können.

4.4 NK-Zellen – Eine heterogene Population

Das Ziel dieser Arbeit war es auch, NK-Zellen in der chronischen Phase der EAE zu untersuchen. Die Rolle der NK-Zellen in der EAE und der MS wird kontrovers diskutiert (Segal, 2007). Ihre wesentliche Funktion besteht in der Induktion des Zelltodes virusinfizierter Zellen und Tumorzellen. Neben dieser Rolle in der angeborenen Immunabwehr konnten jedoch auch so genannte „regulatorische NK-Zellen“ nachgewiesen werden (Lu et al., 2007). Diese NK-Zellen sind in der EAE zur Lyse autoreaktiver T-Zellen fähig, was in Tierexperimenten zu einem mildereren Krankheitsverlauf führte (Segal, 2007). Beim Menschen sind NK-Zellen mit hoher regulatorischer Aktivität durch eine hohe CD56-Expression charakterisiert. Diese Zellen steigen nach Therapie von MS-Patienten mit dem monoklonalen Antikörper Daclizumab und IFN-beta an und vermitteln einen Teil des therapeutischen Effekts. Weiterhin wurde bei invitro Versuchen nachgewiesen, dass CD56⁺ NK-Zellen das Überleben von T-Zellen hemmen können (Bielekova et al., 2006).

Im Gegensatz zu diesen positiven Effekten steht, dass die Arbeitsgruppe von Jack Antel einen schädlichen Effekt von NK-Zellen auf menschliche Oligodendrozyten nachweisen konnte (Morse et al., 2001). Neben NK-Zellen existieren NKT-Zellen, die in Abhängigkeit von IFN- γ und IL-4 sowohl zytotoxisch als auch regulatorisch wirken können. Sie sind mit T-Zellen verwandt und exprimieren einen TCR (Jahng et al., 2001, Singh et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl NK-, als auch NKT-Zellen identifiziert werden, wobei NK-Zellen in der Gesamtzahl deutlich überwogen. Auf beiden Zelltypen wurde der Median der Oberflächenmarker CD11b, CD11c und B220 bestimmt, um dadurch den Reifungsgrad der Zellen zu erfassen.

NK-Zellen zeigten in der akuten EAE einen einmaligen Anstieg der Expression von CD11b. CD11c hingegen zeigte erst in der spät chronischen Phase eine erhöhte Expression. CD11b wird auf NK-Zellen im Zuge der Migration aus dem Knochenmark in die Peripherie exprimiert, woraufhin diese ihre volle Effektorfunktion entwickeln (Hayakawa et al., 2006). Die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen daher für eine Veränderung der Subpopulationen der NK-Zellen mit potentiell unterschiedlichen Funktionen.

In Untersuchungen bei MS-Patienten wurden im Schub erniedrigte Level der CD11c Expression im peripheren Blut nachgewiesen (Aranami et al., 2006). CD11c⁺ NK-Zellen zeigten in Tier-Experimenten die Fähigkeit zur Produktion höherer Level von IFN- γ als andere NK-Zellen. Sie wurden als eine Subpopulation beschrieben, welche verstärkt mit DCs interagiert (Blasius et al., 2007). Unter diesem Aspekt ist der in der vorliegenden Arbeit gemessene CD11c-Anstieg in der späten EAE gut mit der starken Aktivierung der mDCs vereinbar. So wäre es möglich, dass CD11c⁺NK1.1⁺ Zellen auch nach dem initialen Schub mDCs aktivieren und weiterhin zu einer Schädigung führen.

Der untersuchte Aktivierungsmarker B220 war auf NK-Zellen während der gesamten EAE nur in sehr geringem Maße nachweisbar. Es zeigte sich keine Korrelation der B220 Expression mit dem Krankheitslauf. Dies bestätigt die Untersuchungen von Vosshenrich, der an aktivierten NK-Zellen zeigte, dass unterschiedliche Expressionsstärken von B220 nicht mit funktionellen Unterschieden korrelieren (Vosshenrich et al., 2007). Die Ergebnisse zu den NK-Zellen zeigen zusammenfassend erstens eine verstärkte Expression von CD11b in der akuten EAE, was ihrer Reifung zur vollen Effektorfunktion entspricht und zweitens eine verstärkte

Expression von CD11c in der chronischen Phase, was auf ihre Interaktion mit dendritischen Zellen zurückzuführen sein könnte.

NKT-Zellen zeigten im Vergleich zu NK-Zellen eine deutlich stärkere Expression aller Marker, welche sich in der akuten Krankheitsphase massiv reduzierte, um in der chronischen Phase den Ausgangswert nahezu wieder zu erreichen. Jahng und Singh konnten zeigen, dass eine Aktivierung der NKT-Zellen mittels des Glykolipides α -galactosylceramide zu einem milderem Verlauf der EAE führte (Jahng et al., 2001, Singh et al., 2001). In Anbetracht der reduzierten Expression in der akuten Phase liegt es nahe, dass die NKT-Zellen in der akuten EAE weniger aktiviert sind und somit ihr regulatorischer Einfluss auf T-Zellen fehlt. Das erneute Ansteigen der Aktivierungsmarker im Verlauf zusammen mit der klinischen partiellen Remission spricht für eine Aufnahme ihrer regulatorischen Funktion. Unklar bleibt, wieso NKT-Zellen nicht auch in der akuten EAE ihre regulatorische Wirkung auf T-Zellen ausüben können. Möglicherweise ist jedoch die Zytokin-Produktion im akut entzündeten Gewebe so stark, dass es zu einer Anregung der zytotoxischen Funktion der NKT-Zellen kommt.

Zusammenfassend ergibt sich ein sehr heterogenes Bild der NK und NKT-Zellen in der EAE. Weitestgehend fraglich bleibt, welche Zellen eine protektive oder zytotoxische Wirkung in der EAE haben. Um dies weiter zu untersuchen, wäre eine Erfassung der Subpopulationen der NK- und NKT-Zellen sinnvoll, um mögliche immunmodulatorische Fähigkeiten zu erkennen. Einen ersten Ansatz dazu lieferte Winkler-Pickett. Er führte vor der MOG-Immunisierung eine selektive NK-Depletion durch, was zu einem milderem Krankheitsverlauf und einer geringeren Produktion von IFN- γ führte (Winkler-Pickett et al., 2008). In Zukunft werden möglicherweise durch genauere Kenntnis der Funktion einzelner NK-Zell-Subpopulationen neue therapeutische Ansätze entstehen.

5 Zusammenfassung

Multiple Sklerose (MS) ist eine autoimmun-vermittelte Entzündung von Gehirn und Rückenmark die initial meist schubförmig verläuft und im späteren Krankheitsverlauf in eine chronisch progrediente Phase (SPMS) übergeht. Bislang ist unklar, ob und in welcher Form entzündliche Faktoren an dieser Krankheitsphase beteiligt sind. In einem tierexperimentellen Modell der MS, der durch MOG₃₅₋₅₅ Peptid induzierten experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in der C57BL/6 Mauslinie, folgt auf eine initiale akute Krankheitsphase eine durch nur inkomplette Remission gekennzeichnete chronische, stabile Krankheitsphase, welche durch sporadische Schübe unterbrochen sein kann. Anhand dieses Modells einer chronischen autoimmunen Entzündungsreaktion des ZNS wurde untersucht, welche Immunzellen an der Initiierung, der akuten Reaktion sowie an der verbleibenden chronischen autoimmunen Entzündungsreaktion beteiligt sind. Dazu wurde der zeitliche Verlauf der Entzündungsreaktion im ZNS von C57BL/6 Mäusen nach Immunisierung durchflusszytometrisch charakterisiert und später mittels histopathologischer Untersuchungen verifiziert.

Die Entzündungsreaktion im ZNS folgte dabei einer monomodalen Dynamik, welche zeitlich mit dem akuten klinischen Krankheitsverlauf korrelierte. Dabei ließ sich bereits zwei Tage vor Krankheitsbeginn eine geringe Infiltration von CD45⁺ Immunzellen ins ZNS nachweisen. Zu diesem Zeitpunkt infiltrieren vor allem Makrophagen (21%). In der akuten Entzündungsreaktion infiltrierten neben CD4⁺ T-Zellen (8%) massiv Makrophagen (25%) und myeloide dendritische Zellen (DZ, 20%), die damit den größten Anteil des Infiltrates ausmachten. Auf diesen Zellen wurden zu diesem Zeitpunkt auch die Reifungsmarker CD80 und MHCII maximal exprimiert. Etwa sieben Tage nach dem Krankheitsmaximum sank die Anzahl der infiltrierenden Zellen von über 2 Millionen auf etwa 200.000 CD45⁺ Zellen ab, jedoch setzte sich dieses verbliebende chronische Infiltrat vor allem aus noch stark aktivierten myeloiden DZ und CD25-exprimierenden CD4⁺ T-Zellen zusammen. Dies weist darauf hin, dass nach einer entzündlichen Reaktion noch für einen längeren Zeitraum aktivierte Immunzellen im ZNS verbleiben und somit auch noch zu einer weiteren Schädigung des Gewebes beitragen könnten. Zur bildmorphologischen Korrelation der Ergebnisse wurden histologische und immunhistochemische Färbungen des ZNS durchgeführt. Diese zeigten vor allem im cervikalen Rückenmark demyelinisierte

Läsionen mit massiver T-Zell- und Makrophagen-Infiltration. In der chronischen Phase war das Immunzellinfiltrat nur noch schwach nachweisbar, die Demyelinisierung war jedoch konstant. Diese Ergebnisse korrelierten somit gut mit jenen der Durchflusszytometrie.

In der Zukunft könnten funktionelle Experimente mit den chronisch im ZNS verbleibenden Immunzellen durchgeführt werden, um zu klären, inwiefern diese Zellen zur Auslösung weiterer Krankheitsschübe oder zur Entstehung eines chronischen Schadens beitragen können. Solche Experimente könnten zum besseren Verständnis der chronischen Entzündungsprozesse führen und eine Evaluierung neuer Therapiestrategien ermöglichen.

6 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| APC | Allophycocyanin |
| APZ | Antigen-präsentierende Zelle |
| BSA | <i>engl.</i> Bovine Serum Albumin |
| ca. | cirka |
| CD | <i>engl.</i> Cluster of Differentiation |
| CFA | <i>engl.</i> Complete Freund's Adjuvans |
| CIS | <i>engl.</i> Clinically Isolated Syndrome |
| DC | <i>engl.</i> Dendritic Cell |
| DMEM | <i>engl.</i> Dulbecco's modified Eagle's Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNAse | Desoxyribonuklease |
| EAE | Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis |
| et.al. | <i>lat.</i> und andere |
| FACS | <i>engl.</i> Fluorescence activated cell sorting |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FSC | <i>engl.</i> Forward Scatter |
| H.E. | Hämatoxylin Eosin |
| HLA | <i>engl.</i> Human Leukocyte Antigen |
| IFA | <i>engl.</i> Incomplete Freund's Adjuvans |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| KAR | <i>engl.</i> killer-cell activatory receptor |
| KIR | <i>engl.</i> killer-cell inhibitory receptor |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MBP | Myelin-Basic-Protein |
| MFI | <i>engl.</i> mean fluorescence intensity |
| MHC | <i>engl.</i> major histocompatibility complex |
| MOG | Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MS | Multiple Sklerose |

| | |
|----------------|---|
| NK-Zellen | Natürliche Killer-Zellen |
| PAMP | <i>engl.</i> Pathogen Associated Molecular Pattern |
| PBlue | <i>engl.</i> Pacific Blue |
| PBS | <i>engl.</i> Phosphate buffered saline |
| PE | Phycoerythrin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PLP | Proteolipid-Protein |
| PPMS | Primär progressive Multiple Sklerose |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| TLR | <i>engl.</i> Toll-like receptors |
| TMEV | Theiler's murines Enzephalomyelitis Virus |
| TSchG | Tierschutzgesetz |
| T _H | T-Helfer-Zelle |
| RRMS | <i>engl.</i> Relapsing-remitting Multiple Sclerosis |
| SPMS | Sekundär progressive Multiple Sklerose |
| SSC | <i>engl.</i> Sideward Scatter |
| u.a. | unter anderem |
| vgl. | Vergleiche |
| VLA | <i>engl.</i> Very Late Antigen |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZMNH | Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

7 Literaturverzeichnis

- 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, 1910-4.
- ALOTAIBI, S., KENNEDY, J., TELLIER, R., STEPHENS, D. & BANWELL, B. (2004) Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA*, 291, 1875-9.
- AMOR, S., SMITH, P. A., HART, B. & BAKER, D. (2005) Biozzi mice: of mice and human neurological diseases. *J Neuroimmunol*, 165, 1-10.
- ARANAMI, T., MIYAKE, S. & YAMAMURA, T. (2006) Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J Immunol*, 177, 5659-67.
- ARANAMI, T. & YAMAMURA, T. (2008) Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int*, 57, 115-20.
- ASCHERIO, A. & MUNGER, K. L. (2010) Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *J Neuroimmune Pharmacol*, 5, 271-7.
- ASCHERIO, A., MUNGER, K. L. & SIMON, K. C. (2010) Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 9, 599-612.
- BACH, J. F. (2003) Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol*, 3, 189-98.
- BASSO, A. S., FRENKEL, D., QUINTANA, F. J., COSTA-PINTO, F. A., PETROVIC-STOJKOVIC, S., PUCKETT, L., MONSONEGO, A., BAR-SHIR, A., ENGEL, Y., GOZIN, M. & WEINER, H. L. (2008) Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 118, 1532-43.
- BASSOE, P. & GRINKER, R. R. (1930) Human rabies and abies vaccine encephalomyelitis. *Arch. Neurol. Psych.*, 4, 1138-1160.
- BAXTER, A. G. (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*, 7, 904-12.
- BERARD, J. L., WOLAK, K., FOURNIER, S. & DAVID, S. (2010) Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia*, 58, 434-45.
- BERNARD, C. C., LEYDON, J. & MACKAY, I. R. (1976) T cell necessity in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Eur J Immunol*, 6, 655-60.
- BETTELLI, E., BAETEN, D., JAGER, A., SOBEL, R. A. & KUCHROO, V. K. (2006) Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J Clin Invest*, 116, 2393-402.

- BETTELLI, E., PAGANY, M., WEINER, H. L., LININGTON, C., SOBEL, R. A. & KUCHROO, V. K. (2003) Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med*, 197, 1073-81.
- BIELEKOVA, B., CATALFAMO, M., REICHERT-SCRIVNER, S., PACKER, A., CERNA, M., WALDMANN, T. A., MCFARLAND, H., HENKART, P. A. & MARTIN, R. (2006) Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2/Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 5941-6.
- BIELEKOVA, B., HOWARD, T., PACKER, A. N., RICHERT, N., BLEVINS, G., OHAYON, J., WALDMANN, T. A., MCFARLAND, H. F. & MARTIN, R. (2009) Effect of anti-CD25 antibody daclizumab in the inhibition of inflammation and stabilization of disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol*, 66, 483-9.
- BIELEKOVA, B., RICHERT, N., HOWARD, T., BLEVINS, G., MARKOVIC-PLESE, S., MCCARTIN, J., FRANK, J. A., WURFEL, J., OHAYON, J., WALDMANN, T. A., MCFARLAND, H. F. & MARTIN, R. (2004) Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 8705-8.
- BIOSCIENCE, B. (2008) www.bdbioscience.com/spectral/. *Fluorescence Spectrum Viewer*.
- BITSCH, A., SCHUCHARDT, J., BUNKOWSKI, S., KUHLMANN, T. & BRUCK, W. (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain*, 123 (Pt 6), 1174-83.
- BLASIUS, A. L., BARCHET, W., CELLA, M. & COLONNA, M. (2007) Development and function of murine B220+CD11c+NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells. *J Exp Med*, 204, 2561-8.
- BORNSTEIN, M. B., MILLER, A. I., SLAGLE, S., ARNON, R., SELA, M. & TEITELBAUM, D. (1984) Clinical trials of copolymer I in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 436, 366-72.
- BURNS, J., ROSENZWEIG, A., ZWEIMAN, B. & LISAK, R. P. (1983) Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cell Immunol*, 81, 435-40.
- CAMPBELL, D. J. & KOCH, M. A. (2011) Phenotypical and functional specialization of FOXP3(+) regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 11, 119-30.
- CHARCOT, M. (1886) Histologie de la sclerose en plaques. *Gaz Hop*, 141, 554-555.
- COHEN, J. A., BARKHOF, F., COMI, G., HARTUNG, H. P., KHATRI, B. O., MONTALBAN, X., PELLETIER, J., CAPRA, R., GALLO, P., IZQUIERDO, G., TIEL-WILCK, K., DE VERA, A., JIN, J., STITES, T., WU, S., ARADHYE, S. & KAPPOS, L. (2010) Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 362, 402-15.
- CROSS, A. H., STARK, J. L., LAUBER, J., RAMSBOTTOM, M. J. & LYONS, J. A. (2006) Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*, 180, 63-70.
- DEB, C. & HOWE, C. L. (2009) Functional characterization of mouse spinal cord infiltrating CD8+ lymphocytes. *J Neuroimmunol*, 214, 33-42.
- DHIB-JALBUT, S. (2002) Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology*, 58, S3-9.

- DHIB-JALBUT, S. (2007) Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis. *Neurology*, 68, S13-21; discussion S43-54.
- DI SANTO, J. P. (2006) Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol*, 24, 257-86.
- FORD, C. C., JOHNSON, K. P., LISAK, R. P., PANITCH, H. S., SHIFRONIS, G. & WOLINSKY, J. S. (2006) A prospective open-label study of glatiramer acetate: over a decade of continuous use in multiple sclerosis patients. *Mult Scler*, 12, 309-20.
- FREUND, J. & MCDERMOTT, K. (1942) Sensitisation to horse serum by means of adjuvants. *Proc Soc Exo Biol*, 49, 548-553.
- FREUND, J., STERN, E. R. & PISINI, T. M. (1947) Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and mycobacteria in water-in-oil emulsion. *J Immunol*, 57, 179-194.
- FUJINAMI, R. S. & OLDSTONE, M. B. (1985) Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science*, 230, 1043-5.
- FUJINAMI, R. S. & OLDSTONE, M. B. (1989) Molecular mimicry as a mechanism for virus-induced autoimmunity. *Immunol Res*, 8, 3-15.
- GALE, C. R. & MARTYN, C. N. (1995) Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*, 47, 425-48.
- GERSHON, R. K. & KONDO, K. (1970) Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18, 723-37.
- GOLD, R., LININGTON, C. & LASSMANN, H. (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, 129, 1953-71.
- GOLD, R. & RIECKMANN, P. (2007) [Recent advances in the pathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis]. *Nervenarzt*, 78 Suppl 1, 15-24; quiz 25.
- GORDON, S. & MARTINEZ, F. O. (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32, 593-604.
- GRAUER, O., OFFENHAUSSER, M., SCHMIDT, J., TOYKA, K. V. & GOLD, R. (2001) [Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis. Evidence from clinical studies and practical recommendations]. *Nervenarzt*, 72, 577-89.
- GREGORY, S. G., SCHMIDT, S., SETH, P., OKSENBERG, J. R., HART, J., PROKOP, A., CAILLIER, S. J., BAN, M., GORIS, A., BARCELLOS, L. F., LINCOLN, R., MCCAULEY, J. L., SAWCER, S. J., COMPSTON, D. A., DUBOIS, B., HAUSER, S. L., GARCIA-BLANCO, M. A., PERICAK-VANCE, M. A. & HAINES, J. L. (2007) Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet*, 39, 1083-91.
- HAFLER, D. A., COMPSTON, A., SAWCER, S., LANDER, E. S., DALY, M. J., DE JAGER, P. L., DE BAKKER, P. I., GABRIEL, S. B., MIREL, D. B., IVINSON, A. J., PERICAK-VANCE, M. A., GREGORY, S. G., RIOUX, J. D., MCCAULEY, J. L., HAINES, J. L., BARCELLOS, L. F., CREE, B., OKSENBERG, J. R. & HAUSER, S. L. (2007) Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*, 357, 851-62.

- HARLANEUROPE (2008) C57BL/6 Datasheet.
- HARRISON, L. C., DEMPSEY-COLLIER, M., KRAMER, D. R. & TAKAHASHI, K. (1996) Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med*, 184, 2167-74.
- HAUSER, S. L., WAUBANT, E., ARNOLD, D. L., VOLLMER, T., ANTEL, J., FOX, R. J., BAR-OR, A., PANZARA, M., SARKAR, N., AGARWAL, S., LANGER-GOULD, A. & SMITH, C. H. (2008) B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 358, 676-88.
- HAYAKAWA, Y., HUNTINGTON, N. D., NUTT, S. L. & SMYTH, M. J. (2006) Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol Rev*, 214, 47-55.
- HAYES, C. E. (2000) Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc*, 59, 531-5.
- HERBERT, W. J. (1978) *Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals.*, Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- HERRERO-HERRANZ, E., PARDO, L. A., GOLD, R. & LINKER, R. A. (2008) Pattern of axonal injury in murine myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*, 30, 162-73.
- JACKSON, S. J., LEE, J., NIKODEMOVA, M., FABRY, Z. & DUNCAN, I. D. (2009) Quantification of myelin and axon pathology during relapsing progressive experimental autoimmune encephalomyelitis in the Biozzi ABH mouse. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68, 616-25.
- JACOBS, L., SALAZAR, A. M., HERNDON, R., REESE, P. A., FREEMAN, A., JOZEFOWICZ, R., CUETTER, A., HUSAIN, F., SMITH, W. A., EKES, R. & ET AL. (1987) Intrathecally administered natural human fibroblast interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. Results of a multicenter, double-blind study. *Arch Neurol*, 44, 589-95.
- JAHNG, A. W., MARICIC, I., PEDERSEN, B., BURDIN, N., NAIDENKO, O., KRONENBERG, M., KOEZUKA, Y. & KUMAR, V. (2001) Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 194, 1789-99.
- JONES, M. V., NGUYEN, T. T., DEBOY, C. A., GRIFFIN, J. W., WHARTENBY, K. A., KERR, D. A. & CALABRESI, P. A. (2008) Behavioral and pathological outcomes in MOG 35-55 experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 199, 83-93.
- KABAR, E. A., WOLF, A. & BEZER, A. E. (1947) The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J. Exp. Med.*, 85, 117-130.
- KAPPOS, L., RADUE, E. W., O'CONNOR, P., POLMAN, C., HOHLFELD, R., CALABRESI, P., SELMAJ, K., AGOROPOULOU, C., LEYK, M., ZHANG-AUBERSON, L. & BURTIN, P. (2010) A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 362, 387-401.
- KEBIR, H., KREYMBORG, K., IFERGAN, I., DODELET-DEVILLERS, A., CAYROL, R., BERNARD, M., GIULIANI, F., ARBOUR, N., BECHER, B. & PRAT, A. (2007) Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 13, 1173-5.

- KENT, S. J., KARLIK, S. J., CANNON, C., HINES, D. K., YEDNOCK, T. A., FRITZ, L. C. & HORNER, H. C. (1995) A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 58, 1-10.
- KING, I. L., DICKENDESHER, T. L. & SEGAL, B. M. (2009) Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood*, 113, 3190-7.
- KORITSCHONER, R. & SCHWEINBURG, F. (1925) Klinisch und experimentelle Beobachtungen über Lähmungen nach Wutschutzimpfung. *Z. Immunitats Forsh*, 42, 217-283.
- KORN, T., BETTELLI, E., OUKKA, M. & KUCHROO, V. K. (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, 27, 485-517.
- KORN, T., REDDY, J., GAO, W., BETTELLI, E., AWASTHI, A., PETERSEN, T. R., BACKSTROM, B. T., SOBEL, R. A., WUCHERPFENNIG, K. W., STROM, T. B., OUKKA, M. & KUCHROO, V. K. (2007) Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med*, 13, 423-31.
- KRISHNAMOORTHY, G., LASSMANN, H., WEKERLE, H. & HOLZ, A. (2006) Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest*, 116, 2385-92.
- LASSMANN, H., BRUCK, W. & LUCCHINETTI, C. (2001) Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*, 7, 115-21.
- LI, J., RIDGWAY, W., FATHMAN, C. G., TSE, H. Y. & SHAW, M. K. (2007) High cell surface expression of CD4 allows distinction of CD4(+)CD25(+) antigen-specific effector T cells from CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 192, 57-67.
- LISAK, R. P., ZWEIMAN, B., BLANCHARD, N. & RORKE, L. B. (1983) Effect of treatment with Copolymer 1 (Cop-1) on the in vivo and in vitro manifestations of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *J Neurol Sci*, 62, 281-93.
- LU, L., IKIZAWA, K., HU, D., WERNECK, M. B., WUCHERPFENNIG, K. W. & CANTOR, H. (2007) Regulation of activated CD4⁺ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway. *Immunity*, 26, 593-604.
- LUCCHINETTI, C., BRUCK, W., PARISI, J., SCHEITHAUER, B., RODRIGUEZ, M. & LASSMANN, H. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*, 47, 707-17.
- LUNDMARK, F., DUVEFELT, K., IACOBAEUS, E., KOCKUM, I., WALLSTROM, E., KHADEMI, M., OTURAI, A., RYDER, L. P., SAARELA, J., HARBO, H. F., CELIUS, E. G., SALTER, H., OLSSON, T. & HILLERT, J. (2007) Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet*, 39, 1108-13.
- LUNEMANN, J. D., JELCIC, I., ROBERTS, S., LUTTEROTTI, A., TACKENBERG, B., MARTIN, R. & MUNZ, C. (2008) EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med*, 205, 1763-73.
- LUNEMANN, J. D., KAMRADT, T., MARTIN, R. & MUNZ, C. (2007) Epstein-barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? *J Virol*, 81, 6777-84.

- LUTTEROTTI, A. & MARTIN, R. (2008) Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 7, 538-47.
- MANFREDONIA, F., PASQUALI, L., DARDANO, A., IUDICE, A., MURRI, L. & MONZANI, F. (2008) Review of the clinical evidence for interferon beta 1a (Rebif) in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 4, 321-36.
- MARTIN, R., JARAQUEMADA, D., FLERLAGE, M., RICHERT, J., WHITAKER, J., LONG, E. O., MCFARLIN, D. E. & MCFARLAND, H. F. (1990) Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol*, 145, 540-8.
- MARTIN, R., MCFARLAND, H. F. & MCFARLIN, D. E. (1992) Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol*, 10, 153-87.
- MASUHR, K. F. & NEUMANN, M. (2005) *Neurologie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- MCDONALD, W. I., COMPSTON, A., EDAN, G., GOODKIN, D., HARTUNG, H. P., LUBLIN, F. D., MCFARLAND, H. F., PATY, D. W., POLMAN, C. H., REINGOLD, S. C., SANDBERG-WOLLHEIM, M., SIBLEY, W., THOMPSON, A., VAN DEN NOORT, S., WEINSHENKER, B. Y. & WOLINSKY, J. S. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 50, 121-7.
- MENDEL, I., KERLERO DE ROSBO, N. & BEN-NUN, A. (1995) A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol*, 25, 1951-9.
- MILLER, S. D., MCMAHON, E. J., SCHREINER, B. & BAILEY, S. L. (2007) Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci*, 1103, 179-91.
- MORSE, R. H., SEGUIN, R., MCCREA, E. L. & ANTEL, J. P. (2001) NK cell-mediated lysis of autologous human oligodendrocytes. *J Neuroimmunol*, 116, 107-15.
- MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A. & COFFMAN, R. L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136, 2348-57.
- MURPHY, K., TRAVERS, P. & WALPORT, M. (2008) *Janeway's Immunobiology*, New York, Garland Science.
- OKSENBERG, J. R., BARANZINI, S. E., SAWCER, S. & HAUSER, S. L. (2008) The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet*, 9, 516-26.
- OLESZAK, E. L., CHANG, J. R., FRIEDMAN, H., KATSETOS, C. D. & PLATSOUKAS, C. D. (2004) Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis. *Clin Microbiol Rev*, 17, 174-207.
- PAOLILLO, A., COLES, A. J., MOLYNEUX, P. D., GAWNE-CAIN, M., MACMANUS, D., BARKER, G. J., COMPSTON, D. A. & MILLER, D. H. (1999) Quantitative MRI in patients with secondary progressive MS treated with monoclonal antibody Campath 1H. *Neurology*, 53, 751-7.
- PATY, D. W., MERVART, H., CAMPLING, B., RAND, C. G. & STILLER, C. R. (1974) HL-A frequencies in patients with multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*, 1, 211-3.

- PETTE, M., FUJITA, K., KITZE, B., WHITAKER, J. N., ALBERT, E., KAPPOS, L. & WEKERLE, H. (1990) Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology*, 40, 1770-6.
- POLLINGER, B., KRISHNAMOORTHY, G., BERER, K., LASSMANN, H., BOSL, M. R., DUNN, R., DOMINGUES, H. S., HOLZ, A., KURSCHUS, F. C. & WEKERLE, H. (2009) Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med*, 206, 1303-16.
- POLMAN, C. H., O'CONNOR, P. W., HAVRDOVA, E., HUTCHINSON, M., KAPPOS, L., MILLER, D. H., PHILLIPS, J. T., LUBLIN, F. D., GIOVANNONI, G., WAJGT, A., TOAL, M., LYNN, F., PANZARA, M. A. & SANDROCK, A. W. (2006) A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 354, 899-910.
- RASTETTER, W., MOLINA, A. & WHITE, C. A. (2004) Rituximab: expanding role in therapy for lymphomas and autoimmune diseases. *Annu Rev Med*, 55, 477-503.
- REIFF, A. (2005) A review of Campath in autoimmune disease: biologic therapy in the gray zone between immunosuppression and immunoablation. *Hematology*, 10, 79-93.
- RICH, C., LINK, J. M., ZAMORA, A., JACOBSEN, H., MEZA-ROMERO, R., OFFNER, H., JONES, R., BURROWS, G. G., FUGGER, L. & VANDENBARK, A. A. (2004) Myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55 peptide induces severe chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR2-transgenic mice. *Eur J Immunol*, 34, 1251-61.
- RIECKMANN, P. & TOYKA, K. (2004) MS-Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie.
- RIGOLIO, R., BIFFI, A., OGGIONI, N. & CAVALETTI, G. (2008) Actively induced EAE in Lewis rats: characterization of spleen and spinal cord infiltrating lymphocytes by flow cytometry during the course of the disease. *J Neuroimmunol*, 199, 67-74.
- RIVERS, T. M. & SCHWENTKER, F. F. (1935) Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J. Exp. Med.*, 61, 689-702.
- RIVERS, T. M., SPRUNT, D. H. & BERRY, G. P. (1933) Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.*, 58, 39-53.
- ROSE, J. W., WATT, H. E., WHITE, A. T. & CARLSON, N. G. (2004) Treatment of multiple sclerosis with an anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody. *Ann Neurol*, 56, 864-7.
- ROTHUIZEN, L. E., BUCLIN, T., SPERTINI, F., TRINCHARD, I., MUNAFO, A., BUCHWALDER, P. A., YTHIER, A. & BIOLLAZ, J. (1999) Influence of interferon beta-1a dose frequency on PBMC cytokine secretion and biological effect markers. *J Neuroimmunol*, 99, 131-41.
- SADOVNICK, A. D., ARMSTRONG, H., RICE, G. P., BULMAN, D., HASHIMOTO, L., PATY, D. W., HASHIMOTO, S. A., WARREN, S., HADER, W., MURRAY, T. J. & ET AL. (1993) A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol*, 33, 281-5.
- SADOVNICK, A. D. & EBERS, G. C. (1995) Genetics of multiple sclerosis. *Neurol Clin*, 13, 99-118.
- SCHNEIDER, C., SCHUETZ, G. & ZOLLNER, T. M. (2009) Acute neuroinflammation in Lewis rats - A model for acute multiple sclerosis relapses. *J Neuroimmunol*.

- SCHREINER, B., BAILEY, S. L., SHIN, T., CHEN, L. & MILLER, S. D. (2008) PD-1 ligands expressed on myeloid-derived APC in the CNS regulate T-cell responses in EAE. *Eur J Immunol*, 38, 2706-17.
- SCHWENTKER, F. F. & RIVERS, T. M. (1934) The antibody response of rabbits to injection of emulsion and extracts of homologous brain. *J. Exp. Med.*, 60, 559-574.
- SEGAL, B. M. (2007) The role of natural killer cells in curbing neuroinflammation. *J Neuroimmunol*, 191, 2-7.
- SERAFINI, B., ROSICARELLI, B., MAGLIOZZI, R., STIGLIANO, E., CAPELLO, E., MANCARDI, G. L. & ALOISI, F. (2006) Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 124-41.
- SIBLEY, W. A., BAMFORD, C. R. & CLARK, K. (1985) Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet*, 1, 1313-5.
- SINGH, A. K., WILSON, M. T., HONG, S., OLIVARES-VILLAGOMEZ, D., DU, C., STANIC, A. K., JOYCE, S., SRIRAM, S., KOEZUKA, Y. & VAN KAER, L. (2001) Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 194, 1801-11.
- SOMMER, N., ZIPP, F., ROSENER, M., DICHGANS, J. & MARTIN, R. (1996) [Influence of genetic factors on multiple sclerosis]. *Nervenarzt*, 67, 457-64.
- SOSPEDRA, M. & MARTIN, R. (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*, 23, 683-747.
- STEINMAN, L. & ZAMVIL, S. S. (2006) How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 60, 12-21.
- STROMNES, I. M., CERRETTI, L. M., LIGGITT, D., HARRIS, R. A. & GOVERMAN, J. M. (2008) Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med*, 14, 337-42.
- THOMPSON, A. J., POLMAN, C. H., MILLER, D. H., MCDONALD, W. I., BROCHET, B., FILIPPI, M. M. X. & DE SA, J. (1997) Primary progressive multiple sclerosis. *Brain*, 120 (Pt 6), 1085-96.
- TRAPP, B. D., PETERSON, J., RANSOHOFF, R. M., RUDICK, R., MORK, S. & BO, L. (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 338, 278-85.
- VOSSHENRICH, C. A., LESJEAN-POTTIER, S., HASAN, M., RICHARD-LE GOFF, O., CORCUFF, E., MANDELBOIM, O. & DI SANTO, J. P. (2007) CD11c⁺B220⁺ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *J Exp Med*, 204, 2569-78.
- WALDMANN, T. A. (2007) Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey. *J Clin Immunol*, 27, 1-18.
- WALDNER, H., WHITTERS, M. J., SOBEL, R. A., COLLINS, M. & KUCHROO, V. K. (2000) Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3412-7.

- WEINSHENKER, B. G., BASS, B., RICE, G. P., NOSEWORTHY, J., CARRIERE, W., BASKERVILLE, J. & EBERS, G. C. (1989) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain*, 112 (Pt 1), 133-46.
- WEKERLE, H., KOJIMA, K., LANNES-VIEIRA, J., LASSMANN, H. & LININGTON, C. (1994) Animal models. *Ann Neurol*, 36 Suppl, S47-53.
- WILLIAMS, A., ELDRIDGE, R., MCFARLAND, H., HOUFF, S., KREBS, H. & MCFARLIN, D. (1980) Multiple sclerosis in twins. *Neurology*, 30, 1139-47.
- WING, K., SURI-PAYER, E. & RUDIN, A. (2005) CD4+CD25+ regulatory T cells from mouse to man. *Scand J Immunol*, 62, 1-15.
- WINKLER-PICKETT, R., YOUNG, H. A., CHERRY, J. M., DIEHL, J., WINE, J., BACK, T., BERE, W. E., MASON, A. T. & ORTALDO, J. R. (2008) In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses. *J Immunol*, 180, 4495-506.
- WU, J., OHLSSON, M., WARNER, E. A., LOO, K. K., HOANG, T. X., VOSKUHL, R. R. & HAVTON, L. A. (2008) Glial reactions and degeneration of myelinated processes in spinal cord gray matter in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience*, 156, 586-96.
- WUJEK, J. R., BJARTMAR, C., RICHER, E., RANSOHOFF, R. M., YU, M., TUOHY, V. K. & TRAPP, B. D. (2002) Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61, 23-32.
- WYNN, D., KAUFMAN, M., MONTALBAN, X., VOLLMER, T., SIMON, J., ELKINS, J., O'NEILL, G., NEYER, L., SHERIDAN, J., WANG, C., FONG, A. & ROSE, J. W. (2010) Daclizumab in active relapsing multiple sclerosis (CHOICE study): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, add-on trial with interferon beta. *Lancet Neurol*, 9, 381-90.
- YEDNOCK, T. A., CANNON, C., FRITZ, L. C., SANCHEZ-MADRID, F., STEINMAN, L. & KARIN, N. (1992) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*, 356, 63-6.
- YONG, V. W., CHABOT, S., STUVE, O. & WILLIAMS, G. (1998) Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology*, 51, 682-9.
- ZAMVIL, S. S. & STEINMAN, L. (1990) The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol*, 8, 579-621.
- ZHANG, G. X., YU, S., GRAN, B., LI, J., CALIDA, D., VENTURA, E., CHEN, X. & ROSTAMI, A. (2004) T cell and antibody responses in remitting-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in (C57BL/6 x SJL) F1 mice. *J Neuroimmunol*, 148, 1-10.
- ZHU, J., YAMANE, H. & PAUL, W. E. (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*, 28, 445-89.
- ZWAR, T. D., VAN DRIEL, I. R. & GLEESON, P. A. (2006) Guarding the immune system: suppression of autoimmunity by CD4+CD25+ immunoregulatory T cells. *Immunol Cell Biol*, 84, 487-501.

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Professor Roland Martin dafür bedanken, dass er mir die Durchführung dieser experimentellen Doktorarbeit ermöglicht hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Karin Steinbach, die mich mit viel Elan in die Labortechniken eingeführt hat und mir jederzeit mit kreativen und hilfreichen Ideen zur Seite stand.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich während meines Lebensweges stets unterstützt haben und immer mit einem offenen Ohr für mich da waren.

Ann-Kathrin danke ich für das Verständnis, die Geduld und Motivation in der Zeit, während der diese Arbeit entstanden ist.

Ich möchte mich bei Anna, Andreas, Ali, Birgitt, Eva, Ghoncheh, Ilias, Lukas, Manuela, Petra, Pierre, Steffi, Verena und allen anderen Mitgliedern der inims-Forscherguppen für die vielen schönen gemeinsamen Stunden im Labor bedanken.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Johannes Tobias Neumann