

**Aus dem Zentrum für Neurologie Tübingen
Abteilung Allgemeine Neurologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Dichgans**

**Expression der Chemokin-Rezeptoren
CXCR-3 und CXCR-4
auf autoreaktiven T-Zellen bei der
Multiplen Sklerose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Marcus Ahrends
aus Ostfildern-Ruit**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. R. Weissert

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Möhle

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Die multiple Sklerose	1
1.1.1. Symptomatik und klinischer Verlauf der Multiplen Sklerose	1
1.1.2. Diagnostik der Multiplen Sklerose	3
1.1.3. Die pathologischen Befunde der Multiplen Sklerose	4
1.1.4. Pathogenese der Multiplen Sklerose	5
1.2. Immunologische Aspekte der Multiplen Sklerose	9
1.2.1. Mechanismen der Selbsttoleranz	9
1.2.2. Zytokinsekretion der T-Zellen	11
1.2.3. Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)	13
1.2.4. Aufbau der Myelinscheide und potentielle Autoantigene	14
1.2.4.1. Myelin Basic Protein (MBP)	14
1.2.4.2. Basisches Myelinprotein (MBP)	15
1.2.4.3. Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)	15
1.3. CXC – Chemokine und – Rezeptoren	18
1.3.1. Chemokine und ihre Rezeptoren allgemein	18
1.3.2. CXCR3 (CXC-Rezeptor-3) und seine Liganden	23
1.3.3. CXCR4 und seine Liganden	24
1.3.4. Die Rolle der Chemokin-Rezeptoren bei der MS	26
1.3.5. CXCR3 und Multiple Sklerose	27
1.3.6. CXCR4 und Multiple Sklerose	30
1.4. Die Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit	31

2.	Material und Methoden	33
2.1.	Material	33
2.1.1.	Zellkultur	33
2.1.1.1.	Probanden	33
2.1.1.2.	Isolierung mononukleärer Zellen (PBMCs) aus Vollblut	33
2.1.1.3.	Zellfärbung und Zellzahlbestimmung	34
2.1.1.4.	Allgemeine Zellkultur	35
2.1.1.5.	Peptidsequenzen	36
2.1.2.	TaqMan-PCR	36
2.1.2.1.	RNA-Isolierung aus Zellkulturen	36
2.1.2.2.	Transkription der RNA in cDNA	37
2.1.2.3.	TaqMan-PCR Reaktion	38
2.1.2.4.	Primer	39
2.1.3.	Durchflußzytometrie (FACS)	41
2.2.	Methoden	42
2.2.1.	Vorbereitung der PBMC Zellkultur	42
2.2.1.1.	Isolierung mononukleärer Zellen (PBMCs) aus Vollblut	42
2.2.1.2.	Zellfärbung und Zellzahlbestimmung	43
2.2.2.	TaqMan-PCR	44
2.2.2.1.	Zellkultur für TaqMan-PCR	44
2.2.2.2.	Isolierung der RNA aus den Zellen nach Zellkultur	44
2.2.2.3.	Reverse Transkriptase der RNA in cDNA	45
2.2.2.4.	Durchführung der TaqMan-PCR	46
2.2.2.5.	Auswertung der TaqMan-PCR	48
2.2.3.	Durchflußzytometrie (FACS)	49
2.2.3.1.	Zellkultur für FACS	49
2.2.3.2.	Durchführung der FACS-Analyse	50
2.2.3.3.	Auswertung der FACS-Analyse	52
2.2.4.	Statistische Datenauswertung	53

3.	Ergebnisse	54
3.1.	CXCR3	54
3.1.1.	CXCR3-Induktion nach Stimulation mit MOG-Antigenen (TaqMan-PCR)	54
3.1.2.	CXCR3-Expression nach Stimulation mit MOG-Antigenen (FACS)	61
3.1.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse für CXCR3	65
3.2.	CXCR4	66
3.2.1.	CXCR4-Induktion nach Stimulation mit MOG-Antigenen (TaqMan-PCR)	66
3.2.2.	CXCR4-Expression nach Stimulation mit MOG-Antigenen (FACS)	73
3.2.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse für CXCR4	77
3.3.	Vergleich der Expression zwischen CXCR3 und CXCR4 bei nativen PBMC, nach Stimulation mit Myelin-antigenen und Stimulation mit dem Mitogen PHA	78
4.	Diskussion	79
4.1.	CXCR3	80
4.1.1.	Expression von CXCR3 auf nativen PBMC ist bei Patienten mit unterschiedlichem Verlauf und Kontrollen gleich.	80
4.1.2.	Unterschiedliche Expression nach Stimulation mit Antigenen zwischen Patienten und Kontrollen	82

4.1.3.	Deutliche Induktion von CXCR3 nach Stimulation mit MOG-Peptiden und PHA	84
4.1.4.	Modell des Pathomechanismus CXCR3-positiver T-Zellen in der MS	85
4.2.	CXCR4	89
4.2.1.	Expression von CXCR4 auf nativen PBMC ist bei Patienten mit unterschiedlichem Verlauf und Kontrollen gleich.	89
4.2.2.	Expression von CXCR4 auf mit Antigenen stimulierten, aktivierten PBMC ist auch bei allen Gruppen gleich.	91
4.2.3.	Die Stimulation mit Antigenen oder PHA ergab verschiedene Ergebnisse	91
4.3.	Vergleich zwischen CXCR4 und CXCR3	99
4.4.	Schlußüberlegungen	99
5.	Zusammenfassung	100
6.	Tabellen	101
7.	Literaturverzeichnis	115

1. EINLEITUNG

1.1. Die Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende und neurodegenerative Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Sie ist die häufigste nichttraumatische neurologische Erkrankung des jungen und mittleren Erwachsenenalters (Martin et al., 1995).

Die Prävalenz der Multiplen Sklerose weist ein Nord-Süd Gefälle auf, das von den Polen zum Äquator hin abnimmt. So liegt die Prävalenz in Nordeuropa, Nordamerika und Australien bei ca. 100 pro 100.000 Einwohner und in äquatornahen Ländern bei 10 pro 100.000 Einwohner. Die Inzidenz der MS beläuft sich in Nordeuropa auf 4-8 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner (Kurtzke, 1995).

Die Erkrankung manifestiert sich überwiegend im Alter von 20 bis 40 Jahren. Frauen sind zirka doppelt so häufig betroffen wie Männer.

Die Ätiologie der MS ist noch nicht geklärt. Es gibt aber deutliche Hinweise auf ein autoimmunes Geschehen, das auch von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen mitbestimmt wird (Hohlfeld et al., 1995; Martin et al., 1995; Steinmann et al., 1995).

1.1.1. Symptomatik und klinischer Verlauf der Multiplen Sklerose

Der klinische Verlaufs der MS ist inter- und intraindividuell sehr unterschiedlich. Zu Beginn sind ca. 80% der Patienten von der schubförmig-remittierenden Form der MS (relapsing-remitting MS, RR-MS) betroffen, die durch Schübe mit neurologischen Funktionsstörungen unterschiedlicher Art und anschließender (fast) völliger Rückbildung der Symptome gekennzeichnet ist.

Als Schub wird das Neuauftreten neurologischer Ausfälle oder die Verschlechterung bereits vorbestehender Symptome bezeichnet, die mindestens 24 Stunden anhalten (Poser et al., 1983).

Die meisten dieser Patienten gehen innerhalb von 10 Jahren in einen sekundär chronisch-progredienten Verlauf über, bei dem nach einem Schub Ausfälle bestehen bleiben, und es zu einer zunehmenden Verschlechterung der Symptomatik kommt.

In 20% der Fälle liegt eine primär chronisch-progrediente Verlaufsform vor, die eine schlechtere Prognose aufweist (McFarlin, 1982; Steinbrecher et al., 1995). Die Faktoren, die den Krankheitsverlauf bestimmen, sind nicht bekannt (Weinshenker et al., 1989). Eine gute Prognose ist statistisch mit einem frühen Beginn der Erkrankung, weiblichem Geschlecht, dem Auftreten ausschließlich visueller oder sensibler Symptome und wenigen, kurzen Schüben assoziiert (Kesselring, 1997; Weinshenker et al., 1989).

Aufgrund der Demyelinisierung und der eventuellen zusätzlichen axonalen Schädigung ist die Erregungsfortleitung gestört.

Die Läsionen treten typischerweise periventrikulär auf und sind somit nicht an bestimmte Systeme gekoppelt; sie können aber an jeder Stelle im ZNS auftreten. Die Symptome bei der MS sind deswegen sehr variabel. Nahezu jedes pathologische neurologische Zeichen kann bei der MS auftreten (Lassmann, 1998; Lucchinetti et al., 1996).

Die ersten Symptome sind häufig Parästhesien an Händen und / oder Füßen, Paresen und / oder Störungen des visuellen Systems. Auch Ataxien, Dysarthrie und urologische Symptome wie Pollakisurie oder Harninkontinenz können schon früh im Krankheitsverlauf auftreten. Nach längerem Verlauf können sich eine Bulbärhirnsymptomatik, spastische Bewegungseinschränkungen und Sexualfunktionsstörungen entwickeln. Auch kognitive und psychische Störungen wie Depressionen und erhöhtes Suizidrisiko können auftreten (McFarlin, 1982; Poser et al., 1979; Stenager et al., 1996).

Während die Lebenserwartung der Patienten häufig nicht verkürzt ist, kann hingegen die Lebensqualität der Betroffenen, insbesondere aufgrund von Behinderungen, stark beeinträchtigt werden (Sharon et al., 1996).

1.1.2. Diagnostik der Multiplen Sklerose

Die Diagnose kann bis heute nur klinisch und durch bildgebende Verfahren gestellt werden. Einen eindeutigen Krankheitsmarker gibt es (noch) nicht.

Nach den Schumacher-Kriterien von 1965 kann die Diagnose Multiple Sklerose gestellt werden, wenn eine Beteiligung von mehr als zwei Abschnitten des ZNS vorliegt und mindestens zwei zeitlich voneinander getrennte Krankheitsschübe oder eine kontinuierliche Verschlechterung der Symptomatik über mindestens 6 Monate hinweg vorliegen (Schumacher et al., 1965).

Die Poser-Kriterien von 1983 berücksichtigen darüber hinaus die Ergebnisse einer Liquoruntersuchung. Danach kann ein positiver Liquorbefund hinreichend zur Diagnosestellung sein, falls gewährleistet ist, dass sich die neurologischen Symptome nicht auf eine umschriebene Läsion in einer Hirn- oder Rückenmarksregion zurückführen lassen (Poser et al., 1983; Steinbrecher et al., 1995). Ein positiver Liquorbefund liegt bei lymphozytärer Pleiozytose und Immunglobulinvermehrung mit oligoklonalen Banden in der isoelektrischen Fokussierung vor. Er ist aber unspezifisch und erfordert den Ausschluß anderer Differentialdiagnosen.

Zur Standarddiagnostik gehört heute - neben Anamnese und neurologischer Untersuchung - die Kernspintomographie (MRT) des Schädels, die das typische Muster von meist periventrikulär lokalisierten, einzelnen oder disseminierten Läsionen in der weißen Substanz zeigt (Poser et al., 1991). Anhand unterschiedlicher Wichtung der MRT kann zwischen älteren und frischeren entzündlichen Läsionen unterschieden werden. Die in T2-Gewichtung sichtbaren Loci können nach Kontrastmittelgabe in T1-Gewichtung infolge einer Anreicherung mit Gadolinium als aktive, neuere Läsionen dargestellt werden (Miller et al., 1993). Die diagnostische Bedeutung der MRT hat auch in neuere Diagnosekriterien-Schemata Einzug erhalten (McDonald et al., 2001).

Die Diagnose einer MS wird heute aus dem klinischem Krankheitsbild und den Ergebnissen bei bildgebenden Verfahren (Kernspin-tomographie), elektro-physiologischen Messungen und Liquoruntersuchungen gestellt (Miller, 1998).

1.1.3. Die pathologischen Befunde der Multiplen Sklerose

Der Begriff „Multiple Sklerose“, der das Erscheinungsbild der pathologischen Anatomie des Gehirns von MS-Patienten beschreibt, ist im 19. Jahrhundert durch Jean Martin Charcot geprägt worden (Charcot, 1893).

Die Bezeichnung rührte von den makroskopisch sichtbaren, sklerotisch indurierten Entzündungsherden in der weißen Substanz her, die durch die Gliavermehrung und Narbenbildung entstehen und heute als Plaques bezeichnet werden. Frische Plaques erscheinen dabei makroskopisch rosafarben oder gelblich, sind weniger scharf begrenzt und von geringerer Konsistenz, während ältere Läsionen grau-weißlich erscheinen, gut abgegrenzt sind und konfluieren können.

Im Verlauf der MS verändern sich sowohl die Zellzahl und die Zusammensetzung der Entzündungszellen, die die Läsionen infiltrieren, als auch die Lymphokinproduktion (Bongioanni et al., 1996; Bruck et al., 1995).

Während früher Krankheitsstadien sind die Läsionen charakterisiert durch Entzündungsreaktionen, Demyelinisierungen und die sklerotische Umwandlung von Astrozyten.

In aktiven Läsionen findet man perivaskuläre entzündliche Infiltrate, die eine große Anzahl von Entzündungszellen, v. a. Lymphozyten (Booss et al., 1983; Nyland et al., 1982), aber auch Plasmazellen und aktivierte Makrophagen (Lucchinett et al., 1996; Prineas and Wright, 1978; Traugott et al., 1983) enthalten, die u.a. Zytokine und Immunglobuline produzieren. Die Expression von Adhäsionsmolekülen und MHC-Klasse II-Molekülen ist deutlich gesteigert.

Schädigungen von Oligodendrozyten und Axonen sind zu diesem frühen Zeitpunkt nicht immer nachweisbar, doch gibt es Hinweise, dass es schon sehr früh neben der Demyelinisierung zu einer schwerwiegenden Schädigung der Axone kommen kann (Ferguson et al., 1997; Kornek et al., 2000; Trapp et al., 1998).

In späteren Stadien findet man in den inaktiven Läsionen nur noch wenige Lymphozyten und durch die deutliche Reduktion der Oligodendrozyten, die unvollständige Remyelinisierung und die kompensatorische Vermehrung der Astrozyten eine ausgeprägte Fasergliose. Außerdem findet man häufig den fortbestehenden Untergang von Axonen. Diese axonalen Destruktionen sind sehr wahrscheinlich an den längerfristig bestehenden neurologischen Schäden beteiligt und vielleicht auch für eine Verschlechterung der Symptomatik im inaktiven Zustand der Erkrankung verantwortlich (Kornek et al., 2000; Storch et al., 2002; Trapp et al., 1999).

Die Prädilektionsstellen dieser demyelinisierenden Läsionen sind die postkapillären Venolen in der periventrikulären weißen Substanz, das Corpus callosum, der Nervus opticus, das Chisma opticum, der Hirnstamm und das Rückenmark (Raine, 1990).

1.1.4. Pathogenese der Multiplen Sklerose

Es wird davon ausgegangen, dass die Multiple Sklerose durch eine T-Zell - vermittelte Autoimmunreaktion gegen Autoantigene der Myelinscheiden verursacht wird, die durch genetische Faktoren mit beeinflusst wird, vor allem durch den HLA-Haplotyp (Human Leukocyte Antigen) und andere noch weitgehend unbekannt genetische Konstellationen. Auch Umweltfaktoren scheinen eine wichtige Rolle zu spielen.

Dass die Autoaggression von T-Lymphozyten gegen körpereigenes Myelin eine Rolle in der Pathogenese spielt, konnte durch zahlreiche Untersuchungen gezeigt werden, in denen humane T-Lymphozyten aus peripherem Blut von Myelin-Peptiden aktiviert werden konnten (Hohlfeld et al., 1995; Kerlero de Rosbo et al., 1993; Martin et al., 1991; Olsson et al., 1992; Pette et al., 1990; Sun et al., 1991; Wallstrom et al., 1998) und insbesondere auch durch Untersuchungen der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE, siehe unten), dem Tiermodell der Multiplen Sklerose (Ben-Nun et al., 1981; Martin and Farland, 1995; Pettinelli and McFarlin, 1981).

Aber auch eine gegen körpereigenes Myelin gerichtete B-Zell-Antwort trägt wahrscheinlich zur Demyelinisierung bei (Reindl et al., 1999).

Es ist nur noch nicht geklärt, ob diese Autoreaktion gegen körpereigene Myelinbestandteile die Krankheit primär auslöst, oder ob es sich dabei um eine Folgereaktion handelt, die erst sekundär beim Eintritt der Immunzellen in das ZNS auftritt. Forschungen an der EAE sprechen für eine primäre Immunantwort (Martin et al., 1992 a; Olsson, 1992; Steinmann, 1996).

Das ZNS besitzt als immunologisch privilegiertes Organ (Streilein, 1993) kein lymphatisches Gewebe und verfügt unter normalen Bedingungen nur über eine geringe Expression von MHC-Molekülen, die für eine Aktivierung von T-Zellen erforderlich sind (Neumann et al., 1995; Neumann and Wekerle, 1998).

Die einzigen ortsansässigen Immunzellen des ZNS sind Mikroglia-Zellen (Perry, 1994), für die in Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass sie in aktiviertem Zustand Myelin angreifen können (Trapp et al., 1998).

Aktivierte T-Lymphozyten können die Blut-Hirn-Schranke unabhängig von ihrer Spezifität passieren (Wekerle et al., 1986). Diese Migration von T-Zellen in das ZNS wird durch Adhäsionsmoleküle vermittelt (Brosnan et al., 1995). Diese werden auf Endothelzellen und Leukozyten exprimiert, nicht jedoch im Hirngewebe gesunder Individuen (Brosnan et al., 1995).

Von wohl entscheidender Bedeutung bei der Pathogenese der MS sind Zytokine, die von T-Zellen sezerniert werden, v. a. IFN- γ , IL-2 und TNF- α . Sie sind nicht nur an der Entzündungsreaktion im ZNS beteiligt (Navikas and Link, 1996; Olsson, 1995 a; Selmaj and Raine, 1988), sondern induzieren auch Leukozytenadhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und auch auf Astrozyten (Brosnan et al., 1995; Lee and Benveniste, 1999). Außerdem werden MHC-II-Moleküle durch diese Zytokine hochreguliert, sogar auf Endothelzellen und Astrozyten (Traugott, 1987; Vass and Lassmann, 1990).

Bei vielen Autoimmun-Erkrankungen tragen die Major Histocompatibility Complex (MHC) Moleküle, die durch die HLA-Gene beim Menschen kodiert werden, zu einer Prädisposition bei (McDevitt, 1998; Vyse and Todd, 1996). Die erhöhte Suszeptibilität für Menschen mit bestimmten HLA-Haplotypen konnte in einigen Studien auch für die MS gezeigt werden. Die MHC-klasse-II Moleküle, die am häufigsten mit der MS assoziiert sind, sind HLA-DR2 (DRB1*1501, DRB5*0101), HLA-DQ6 (DQA1*0102, DQB1*0602) und HLA-DR4 (DRB1*0401) (Haines et al., 1998; Muraro et al., 1997; Olerup and Hillert, 1991; Spurkland et al., 1991; Yaouang et al., 1997).

Auch Experimente mit Ratten bei der EAE zeigten, dass die Prädisposition für eine Erkrankung und der Verlauf von dem MHC-Haplotyp abhängt (Weissert et al., 1998).

Es sind sehr wahrscheinlich auch eine Reihe anderer Gene regulierend an der Pathogenese der MS beteiligt (Ebers et al., 1996; Sawcer et al., 1996).

Zwillingstudien konnten zeigen, dass das Risiko eines eineiigen Zwillings, an MS zu erkranken, bei etwa 30% liegt, wenn der andere Zwilling erkrankt ist; für zweieiige Zwillinge dagegen beträgt das Risiko nur etwa 2-4% (Compston and Sadovnick, 1992; Ebers et al., 1986). Außerdem haben Verwandte von MS-Patienten ein erhöhtes Risiko, ebenfalls zu erkranken (Sadovnick et al., 1988). Diese Populationsstudien unterstreichen, dass genetische Merkmale die Suszeptibilität entscheidend mitbestimmen, aber auch, dass Umweltfaktoren eine Rolle spielen müssen, wofür auch die geographische Verteilung spricht (Kurtzke, 1995).

Außerdem konnte in Migrationsstudien gezeigt werden, dass Emigranten unter 15 Jahren die Erkrankungswahrscheinlichkeit des Landes annehmen, in das sie immigrierten, während für erwachsene Emigranten das Erkrankungsrisiko des Heimatlandes bestehen bleibt (Sawcer and Goodfellow, 1998).

Eine Fülle von Umweltfaktoren sind schon diskutiert worden, darunter Temperatur, Nahrung, Schädeltraumen und entzündliche ZNS-Erkrankungen (Waksman, 1995).

Insbesondere Virusinfektionen wurden häufig als mögliche Krankheitsauslöser diskutiert (Fujinami and Oldstone, 1985; Soldan et al., 1997).

Das zugrunde liegende Konzept das Molekularen Mimikry, d. h. dass Pathogene wie Viren gemeinsame Peptidsequenzen mit einem körpereigenen Stoff besitzen, woraufhin es zu einer Kreuzreaktion der Immunantwort kommt, wurde schon vielfach als bedeutend für die Pathogenese von Autoimmunkrankheiten beschrieben (Fujinami and Oldstone, 1985; Jahnke et al., 1985; Oldstone, 1987).

Für die MS konnte ein solcher Erreger aber noch nicht nachgewiesen werden.

1.2. Immunologische Aspekte der Multiplen Sklerose

1.2.1. Mechanismen der Selbsttoleranz

CD4-positive T-Lymphozyten erkennen Antigene, wenn sie, an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden, von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden und es zu einer Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) mit dem MHC-Antigen-Komplex kommt und kostimulatorische Signale vermittelt werden (Unanue, 1995).

Durch die Ausbildung des MHC-Antigen-TCR-Komplexes werden die T-Zellen aktiviert und differenzieren sich unter dem Einfluß verschiedener Mediatoren entweder in inflammatorische Th1-Zellen oder Th2-Helferzellen, die ihrerseits ein unterschiedliches Zytokinprofil aufweisen (Seder and Paul, 1994).

Durch verschiedene Mechanismen reifen T-Lymphozyten zu immun-kompetenten Zellen, die sich nur gegen körperfremde Antigene richten. Maßgeblich für diese Reifung sind die positive und die negative Selektion im Thymus. Bei der positiven Selektion werden diejenigen Zellen durch Induktion von Apoptose aussortiert, die keine ausreichende Affinität zu MHC-Molekülen auf den Epithelzellen des Thymus aufweisen. Somit wird gewährleistet, daß nur immunkompetente Zellen in den Pool der Immunabwehrzellen aufgenommen werden (Blackman et al., 1989; Jameson et al., 1995; Viret et al., 1999).

Die negative Selektion entfernt - auch wiederum durch Apoptoseinduktion - diejenigen Zellen aus dem Repertoire, die eine zu hohe Affinität zum MHC-Selbstantigen-Komplex der Antigen-präsentierenden Zellen aufweisen, wodurch potentiell selbstreaktive T-Lymphozyten eliminiert werden, bevor sie den Thymus verlassen (Amsen et al., 1998; Kappler et al., 1987; Sha et al., 1988). Bei der negativen Selektion interagieren die reifenden T-Zellen nicht mit thymalen Epithelzellen, sondern mit professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), hauptsächlich dendritischen Zellen und Makrophagen, die aus dem Knochenmark stammen.

Dennoch ist es durch diese Mechanismen allein nicht möglich, die Reifung selbst-reaktiver T-Zellen vollständig zu verhindern, schon alleine aus dem Grund, dass im Thymus nicht alle Selbstantigene von den APC exprimiert werden können, auch wenn der Expressionsnachweis einiger wichtiger potentieller Autoantigenen, darunter Insulin, MBP und Thyreoglobulin, im Thymus gelang (Klein und Kyewski, 2000; Pribyl et al., 1996; Sospedra et al., 1998).

So konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Patienten als auch bei gesunden Kontrollen potentiell autoreaktive T-Zellen, die spezifisch auf unterschiedliche Selbstantigene reagieren, im peripheren Blut zirkulieren. Das konnte unter anderem auch für die Autoantigene gezeigt werden, die wohl bei der Pathogenese der MS von entscheidender Bedeutung sind (MBP, MOG, PLP) (Kerlero de Rosbo et al., 1993; Olsson et al., 1992; Wallstrom et al., 1998).

Es ist inzwischen durch diverse Untersuchungen belegt, dass auch in der Peripherie, d.h. nach der Reifung im Thymus eine Eliminierung autoreaktiver T-Zellen stattfindet (Klein and Kyewski, 2000; Liu und Janeway, 1990; Scheinecker et al., 2002).

Es gibt einige weitere Mechanismen, durch die verhindert werden kann, dass die potentiell autoreaktiven T-Zellen auch wirklich gegen die Selbstantigene vorgehen. So werden T-Zellen in Abwesenheit adäquater kostimulatorischer Signale bei Interaktion mit dem MHC-Antigen-Komplex anergisch (Janeway, 2002; Rammensee, 1991). Auch regulatorische T-Lymphozyten können eine wichtige Rolle spielen und durch Sekretion immunmodulatorischer Zytokine eine Autoaggression der T-Zellen verhindern (Itoh et al., 1999; Salomon et al., 2000; Seddon and Mason, 1999).

Ein Erklärungsversuch, warum autoreaktive T-Zellen gegen Myelinbestandteile sowohl bei MS Kranken als auch bei gesunden Kontrollen zu finden sind, aber nur bei den Kranken eine Schädigung verursachen können, ist, dass das Expressionsniveau des Autoantigens bei gesunden Personen zu gering ist, oder dass zusätzlich ein anderer Faktor vorliegen muss, wie eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (Barker and Billingham, 1977; Guerder et al., 1994).

1.2.2. Zytokinsekretion der T-Zellen

CD4⁺ T-Helferzellen können anhand ihres Zytokinprofils in 2 Gruppen unterteilt werden, Th1- Zellen und Th2- Zellen, deren Zytokine auf die andere Gruppe jeweils inhibitorisch wirken.

- (a) Th1-Zellen sezernieren Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interferon-gamma (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2) und Lymphotoxin (LT=TNF- β), vor allem nach Stimulation mit IL-12. Diese Th1-Zytokine vermitteln zelluläre Entzündungsreaktionen, u.a. durch Makrophagenaktivierung, und sind an der Abwehr intrazellulärer Krankheitserreger und der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ beteiligt (Crucian et al., 1996; Oksaranta et al., 1996; Olsson, 1995 a).
- (b) Th2-Zellen sezernieren u. a. die Interleukine IL-4, -5, -10 und -13 und TGF- β und regulieren die humorale Immunantwort, indem sie die Expansion und Immunglobulinsekretion von B-Lymphozyten induzieren. Außerdem sind sie an Hypersensitivitätsreaktionen vom Soforttyp und der Bekämpfung von Parasiten beteiligt (Navikas and Link, 1996).

Es gibt deutliche Hinweise, dass die Zytokine eine zentrale Rolle in der Pathogenese der MS spielen, wobei die Th1-Zytokine eher eine Krankheitsprogression und die Th2-Zytokine eher eine Verbesserung der Symptomatik zu bewirken scheinen (Navikas and Link, 1996; Olsson, 1995 a).

So konnte gezeigt werden, dass eine Suppression der TNF- α -Sekretion durch Rolipram bei der EAE eine Milderung des Krankheitsverlaufs bewirkt und TNF- α für Oligodendrozyten direkt zytotoxisch ist (Selmaj and Raine, 1988; Sommer et al., 1995). Bei Patienten mit aktiver Erkrankung können höhere Konzentrationen von mRNA für TNF- α , LT und IFN- γ gegenüber Patienten mit stabiler Erkrankung nachgewiesen werden. Außerdem ist die Anzahl der TNF- α oder LT-produzierenden T-Zellen bei MS Patienten größer als bei gesunden

Kontrollpersonen (Olsson, 1995 b). MS Patienten mit chronischem Verlauf wiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine gesteigerte IL-12-Sekretion mit konsekutivem TNF- α und IFN- γ Anstieg auf (Balashov et al., 1997; Ferrante et al., 1998). Darüber hinaus weisen chronisch-aktive Läsionen die größte Konzentration an TNF- α auf, während in stummen chronischen Plaques kein TNF- α nachgewiesen werden kann (Brosnan et al., 1995). Genauso wurde IFN- γ im Randbereich aktiver MS-Läsionen nachgewiesen, nicht jedoch in nicht betroffener weißer Substanz (Vartanian et al., 1995). Es konnte auch durch Liquoruntersuchungen gezeigt werden, dass der TNF- α -Gehalt im Liquor bei Patienten mit progressiver MS mit der Blut-Hirn-Schranken-Schädigung und mit dem individuellen Grad der Behinderung korreliert ist (Rieckmann et al., 1995; Sharief and Hentges, 1991; Sharief et al., 1993). IFN- γ ist im Liquor schlecht nachweisbar, aber es konnte eine erhöhte IFN- γ Produktion von zirkulierenden T-Zellen in Patienten mit akuter MS gezeigt werden (Hartung et al., 1995).

In den MS Läsionen konnten nicht nur die proinflammatorischen Zytokine sondern auch die Zytokine der Th2-Zellen nachgewiesen werden, z.B. IFN- β , IL-4, IL-10 und TGF- β (Burger and Dayer, 1995). Diese auch als regulatorische Zytokine bezeichneten Zytokine hemmen die Synthese der Th1-Zytokine und die Makrophagenaktivierung (Burger and Dayer, 1995). Das gleichzeitige Auftreten proinflammatorischer wie regulatorischer Zytokine in aktiven Läsionen kann ein Hinweis darauf sein, dass bei der MS demyelinisierende und reparative Prozesse nebeneinander ablaufen. Dass die Th2-Zytokine für die Reparatur und Regeneration förderlich sind, wurde durch Experimente belegt, die zeigten, dass TGF- β und IL-10 mit der Reparatur der Läsionen und dem Ende der Entzündungsaktivität korrelieren (Olsson, 1995 b). Diese regulatorischen Zytokine sind jedoch, im Gegensatz zu den Th1-Zytokinen, auch im Hirngewebe gesunder Kontrollpersonen nachweisbar (Brosnan et al., 1995).

1.2.3. Experimentelle autoimmune (allergische) Enzephalomyelitis (EAE)

Die EAE ist eine akute schubförmig oder chronisch verlaufende demyelinisierende Erkrankung, die als Tiermodell für die Multiple Sklerose dient. Viele Erkenntnisse über die MS wurden aus tierexperimentellen Beobachtungen der EAE gewonnen (Martin and Farland, 1995).

Die Induktion der EAE in den Versuchstieren, meistens Mäuse oder Ratten, gelingt entweder durch aktive Immunisierung mit den autoantigenen Myelinbestandteilen, z.B. MBP, (Wekerle et al., 1994) oder durch passive Übertragung (adoptive transfer) von Th1-Lymphozyten, die spezifisch gegen Myelinproteine gerichtet sind (Ben-Nun et al., 1981; Martin and Farland, 1995; Pettinelli and McFarlin, 1981).

Es gibt bei Tieren keine bekannte spontane Form der EAE. Kritiker dieses Modells bemängeln daher, dass die EAE ein künstlich induziertes Modell sei. Dies muss aber kein Nachteil sein, da die MS bei Menschen ebenso eine von außen induzierte Krankheit sein kann, wie man aus Zwillingsstudien mit eineiigen Zwillingen schließen kann, die nur eine Konkordanzrate von 30% haben, und somit bis heute unbekannte Umweltfaktoren eine wesentliche Rolle spielen müssen. Viel diskutiert wird z.B. die Krankheitsinduktion durch Viren.

Die ersten EAE Modelle, die MBP und PLP als Autoantigene verwendeten, zeigten nur einen monophasischen Krankheitsverlauf mit T-Zell- und Makrophageninfiltration in das ZNS, ohne den für die MS typischen rezidivierenden Verlauf und ohne die typischen Demyelinisierungen, weshalb die EAE nur begrenzt als gültiges Modell für die EAE akzeptiert wurde.

In den letzten Jahren konnten jedoch nach Immunisierung von DA-Ratten mit MOG EAE Modelle entwickelt werden, die den typischen chronisch-rezidivierenden MS-Krankheitsverlauf mit Demyelinisierungen und Axonschädigungen aufwiesen (Kornek et al., 2000; Lorentzen et al., 1995; Storch et al., 1998; Weissert et al., 1998)

1.2.4. Aufbau der Myelinscheide und potentielle Autoantigene

Myelinscheiden umgeben Axone und bewirken durch diese Art von Isolierung eine schnellere Nervenleitgeschwindigkeit. Myelin besteht aus Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen. Es wird im ZNS von Oligodendrozyten und im Peripheren Nervensystem von Schwannschen Zellen gebildet. Der Anteil und die Verteilung der verschiedenen Proteinbestandteile unterscheiden sich dabei. Die Myelinproteine sind wohl die Zielmoleküle, gegen die sich autoreaktive T-Zellen richten, nachdem sie auf MHC-Klasse II-Moleküle von Astrozyten und Mikroglia Zellen im ZNS präsentiert werden. MBP und PLP bilden hauptsächlich den inneren Anteil der Myelinscheide. MOG macht nur einen kleinen Teil der Myelinproteine aus, ist aber hauptsächlich an der Außenseite der Myelinscheiden exprimiert und dadurch für Zellen des Immunsystems vermutlich besser zugänglich (Gardinier et al., 1992; Piddlesden et al., 1993)

1.2.4.1. Myelin Basic Protein (MBP)

MBP stellt 10-20% des Proteinanteils des Myelin im ZNS dar. Es existiert in verschiedenen Isoformen mit einer Größe von 14-21 kDalton (Martin et al., 1992). MBP befindet sich nur intrazellulär und ist von Bedeutung bei der Kompaktierung des Myelins. Das Immunsystem erkennt meist nur bestimmte Regionen, sogenannte Epitope, eines Proteins. Für das MPB wurden verschiedene immundominante Regionen gefunden, wobei sich die hauptimmunogene Region im Mittelteil des Proteins befindet (Aminosäuren 83-102) (Martin et al., 1991; Ota et al., 1990). Die immundominanten Regionen bei verschiedenen Versuchstierstämmen stimmen mit denen beim Menschen überein, was die Gültigkeit der EAE als Tiermodell der MS bestärkt.

MBP spezifische Zellen konnten sowohl bei MS-Patienten als auch bei gesunden Kontrollen als Bestandteile des natürlichen T-Zell Repertoires gefunden werden (Burns et al., 1983; Martin et al., 1992; Ota et al., 1990).

1.2.4.2. **Proteolipid Protein (PLP)**

PLP ist mit einem Anteil von 50% am Myelinprotein des ZNS ein Hauptbestandteil des Myelins. Es gibt 2 Isoformen mit Molekulargewichten von 30 bzw. 26 kD. Neben dem MBP hat PLP mit seinen 4-5 transmembranären Domänen eine entscheidende funktionelle Rolle beim Aufbau des Myelins (Martini and Schachner, 1997).

Experimentelle Untersuchungen sind schwierig gewesen, da PLP ausgesprochen hydrophob ist. Mit Hilfe synthetischer Peptide konnte das Protein näher charakterisiert werden. Aus Proben von MS- Patienten konnten dadurch T-Zelllinien generiert und mit deren Hilfe zwei immundominante Regionen des Proteins bestimmt werden (Aminosäuren 40-60 bzw. Aminosäuren 89-106) (Pelfrey et al., 1993; Pelfrey et al., 1994).

PLP- und MBP- spezifische T-Zelllinien sind sich bezüglich ihres Phänotyps und ihrer Funktion sehr ähnlich. Auch gegenüber PLP gibt es sowohl bei MS- Patienten als auch bei gesunden Probanden PLP-reaktive T-Zellen im natürlichen T-Zell-Repertoire (Sun et al., 1991; Trotter et al., 1991)

1.2.4.3. **Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)**

MOG macht nur einen sehr geringen Teil des Myelinproteins aus (0,05-0,1%) und wird auf der Myelinoberfläche und der Oberfläche von Oligodendrozyten exprimiert (Abo et al., 1993; Birling et al., 1993).

MOG wird innerhalb des HLA interspeziell höchst konservativ kodiert und gehört zur Immunglobulin-Superfamilie. Es besteht aus 218 Aminosäuren, wobei die Aminosäuren 1-122 die N-terminale extrazelluläre immunglobulin (Ig)-artige Domäne und die Aminosäuren 123-218 den C-terminalen transmembranären (AS 123-155) und intrazellulären Anteil bilden (Gardinier et al., 1992; Kroepfl et al., 1996; Pham-Dinh et al., 1993).

Die Funktion von MOG ist bis heute unbekannt, jedoch könnte die extrazelluläre Immunglobulin-Domäne auf eine Rezeptorfunktion hindeuten (Iglesias et al., 2001).

Insbesondere die Ähnlichkeiten in der Histopathologie und dem Krankheitsverlauf zwischen der durch MOG induzierten EAE und der MS mit demyelinisierenden Läsionen und Axonschädigungen und einem remittierenden Verlauf, der bei der EAE mit anderen Autoantigenen nicht gezeigt werden konnte, verleiht MOG eine Sonderstellung unter den Autoantigenen (Kornek et al., 2000; Lorentzen et al., 1995; Storch et al., 1998; Weissert et al., 1998).

Neben einer autoimmunen T-Zellreaktivität sind wahrscheinlich auch Autoantikörper gegen MOG an der demyelinisierenden Pathogenese der EAE und MS beteiligt (Linnington et al., 1988; Reindl et al., 1999).

Es gab einige Untersuchungen, die zeigen konnten, dass jedes der beschriebenen Autoantigene bestimmte immunodominante Epitope aufweisen, die vom HLA-Haplotyp abhängig sind. Die MHC-Klasse II-Moleküle, die am häufigsten mit der MS assoziiert sind, sind HLA-DR2 (DRB1*1501, DRB5*0101), HLA-DQ6 (DQA1*0102, DQB1*0602) und HLA-DR4 (DRB1*0401) (Muraro et al., 1997; Olerup and Hillert, 1991; Spurkland et al., 1991; Yaouanq et al., 1997).

Bei Untersuchungen dieser HLA-Haplotypen mit MOG-Peptiden konnten die immundominanten Epitope des MOG bestimmt werden.

In Experimenten mit HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenen Mäusen wurde das immundominante Epitop MOG 97-108 gefunden. Außerdem wurde gleichzeitig gezeigt, dass humane B-Zellen, die HLA-DR4 exprimierten, rekombinantes humanes MOG so prozessieren, dass sie dieses Peptid 97-108 T-Zellen präsentieren und aktivieren (Forsthuber et al., 2001).

Frühere Tierexperimente zeigten schon, dass diese Region MOG 90-116 ein immundominantes Epitop bei Dark Agouti (DA)-Ratten (MOG 93-107; Stefferl et al., 2000), SJL/J Mäusen (MOG 92-106; Amor et al., 1994) und Rhesus-Affen (MOG 94-116; Kerlero de Rosbo et al., 2000) darstellt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass dieses Epitop auch eine Rolle in der Pathogenese der MS beim Menschen spielt (Forsthuber et al., 2001).

Untersuchungen von Lymphozyten von HLA-DR2(15)+ Patienten und Kontrollen aus peripherem Blut zeigten in ELISPOT-Essays bei Patienten eine erhöhte Reaktivität nach Stimulation mit verschiedenen MOG-Peptiden gegenüber den gesunden HLA-DR2(15)+ Kontrollen. Das immundominanteste Epitop der untersuchten Peptide war MOG 63-87 (Wallström et al., 1998).

Eine neuere, umfassendere Untersuchung, bei der das gesamte MOG Protein in überlappenden 16-Aminosäuren langen Peptiden in ELISPOT-Essays auf immundominante Epitope bei HLA-DRB1*1501-positiven MS-Patienten und Kontrollen untersucht wurde, ergab, dass der transmembrane/intrazelluläre Teil von MOG deutlich immunogener ist als der extrazelluläre Teil, mit dem immundominantesten Epitop in der Region MOG 141-160 (Kernepitop 146-154) (Weissert et al., 2002).

Schon vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass der extrazelluläre Anteil von MOG (Aminosäuren 1-122) EAE bei Versuchstieren induzieren kann (Adelmann et al., 1995).

1.3. CXC - Chemokine und – Rezeptoren

1.3.1. Chemokine und ihre Rezeptoren allgemein

Der Begriff 'Chemokin' ist eigentlich eine Kurzform für 'chemoattractant cytokine'. Es handelt sich hierbei also um eine Untergruppe der Zytokine.

Chemokine vermitteln ihren biologischen Effekt über eine Bindung an spezielle Chemokin-Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche unterschiedlicher Zellen befinden.

Die Interaktion der Chemokine mit ihrem Rezeptor erfolgt über zwei Bindungsstellen der Chemokine. Zum einen über die N-terminale Region, zum anderen über einen prominenten Loop zwischen β -Faltblattstrukturen, der zwischen dem 2. und 3. Cystein herausragt. Es wird vermutet, dass diese Loop-Region zuerst erkannt wird, und dass diese Interaktion wichtig ist für die korrekte Präsentation der Signal-transduzierenden N-terminalen Bindungsstelle (Clark-Lewis et al., 1995).

Die N-terminalen Aminosäuren sind die kritischen Komponenten für die biologische Aktivität. So kann das Hinzufügen einer einzelnen Aminosäure im MCP-1 Molekül die biologische Aktivität um den Faktor 100 oder 1000 verringern (Gong and Clark-Lewis, 1995), und die Deletion einer Aminosäure kann beispielsweise ein Chemoattractant für Basophile in ein Chemoattractant für Eosinophile umwandeln (Weber et al., 1996). Auf diese Weise können auch Chemokin-Rezeptor-Antagonisten hergestellt werden. So wurde ein potenter CXCR4-Antagonist durch Modifikation der ersten beiden N-terminalen Aminosäuren von SDF-1 kreiert (Crump et al., 1997).

Die Chemokin-Rezeptoren gehören zu der großen Gruppe der heterotrimeren G-Proteine, die 7 Transmembran-Domänen aufweisen. Die G-Protein-Untereinheiten aktivieren in einer Kaskade verschiedene Effektorenzyme, darunter Phospholipasen, die am Ende zu einer Inositol-Trisphosphat Produktion, einem Anstieg des intrazellulären Kalziums oder einer Aktivierung von Protein-Kinasen führen (Horuk, 2001). Der chemotaktische Effekt wird durch Polymerisation monomeren Aktins zu filamentösem Aktin (F-Aktin) erreicht, die auch durch die G-Protein-Untereinheiten induziert wird. Diese Aktin-Polymerisation initiiert Veränderungen am Zytoskelett, die schließlich die Fortbewegung der Zelle in Richtung des Chemokingradienten bewirken (Murphy, 1994).

Die Chemokin-Rezeptoren lassen sich in zwei große Klassen und zwei kleinere Klassen unterteilen (Lindley et al., 1993). Die beiden großen Klassen werden von den CC-Rezeptoren (CCR1 – CCR10), auch β -Rezeptoren genannt, und den CXC-Rezeptoren (CXCR1 – CXCR6) oder α -Rezeptoren gebildet. Die beiden kleineren Klassen werden als CX3C-Rezeptoren und C-Rezeptoren bezeichnet.

Die Nomenklatur ist vom strukturellen Aufbau der Chemokine abgeleitet. Chemokine besitzen 4 konservierte Cysteinbausteine, die 2 essentielle Disulfidbrücken ausbilden. Bei den CC-Chemokinen liegen die beiden N-terminalen Cysteine unmittelbar nebeneinander, bei den CXC-Chemokinen sind sie von einer anderen Aminosäure getrennt.

Diese Unterscheidung ist von Bedeutung, da jeder dieser Rezeptoren nur Liganden der zugehörigen Klasse binden kann, häufig jedoch verschiedene mit hoher Affinität. Ebenso können diverse Liganden an verschiedene Rezeptoren ihrer Klasse binden. Die Chemokin-Rezeptoren DARC und D6 bilden die Ausnahmen dieser Regel, da sie gleichermaßen CC und CXC-Chemokine binden können (Horuk et al., 1993; Nibbs et al., 1997), wobei DARC (Duffy antigen receptor for chemokines), die Duffy-Blutgruppen-Determinante auf Erythrozyten und Eintrittsportal für den Malaria-Parasiten *Plasmodium vivax*, keine signaltransduzierende Wirkung nach Chemokin-Bindung aufweist.

Darüber hinaus ist das Spektrum der Zellen, auf die die Chemokine der beiden Klassen ihre Effekte ausüben, verschieden. CXC Chemokine sind spezifisch für Neutrophile und/oder aktivierte T-Zellen. Nur Chemokine, die ein konserviertes Glutamat-Leuzin-Arginin (ELR-) Motiv in der N-terminalen Rezeptorbindungsstelle besitzen, wirken chemotaktisch auf Neutrophile. Zu den Non-ELR α -Chemokinen gehören IP-10 und MIG, die Liganden von CXCR3, die chemotaktisch auf T-Zellen und Monozyten wirken (Luster and Leder, 1993; Taub et al., 1993). CC Chemokine dagegen wirken auf Monozyten, Eosinophile, Basophile und T-Zellen; entsprechend finden sich die zugehörigen Rezeptoren nur auf den entsprechenden Zellentypen (Ransohoff, 1999). Eine Ausnahme von dieser Regel bildet CXCR4, der fast ubiquitär und auch auf Monozyten vorkommt (Baggiolini 1998; Luster, 1998).

1987 wurde das erste Chemokin, IL-8, der Prototyp der CXC-Chemokine, entdeckt und auch seine Funktion als potentes Chemoattractant für Neutrophile (Yoshimura, 1987). Bis vor einigen Jahren dachte man, dass Chemokine nur die Funktion besäßen, verschiedene Arten von Blut-Leukozyten zu den Orten von Infektionen und Entzündungen zu locken. Heute weiß man, dass Chemokine auch wichtige regulatorische Moleküle bei der Leukozyten-Reifung, dem 'Homing' von Lymphozyten und der Entwicklung lymphatischer Gewebe sind (Baggiolini, 1998).

Der chemotaktische Effekt der Chemokine auf Leukozyten bewirkt nicht nur eine Veränderung des Zytoskeletts der Leukozyten, sondern induziert in ihnen auch die Expression und Aktivierung von Integrinen, die es ermöglichen, an das Blutgefäßendothel zu adhären (Springer, 1994). An der Diapedese von Leukozyten durch das Endothel sind verschiedene Mechanismen beteiligt. Chemokine adhären lokal an der Glykokalix der Endothelzelloberflächen, wodurch der chemotaktische Gradient aufgebaut wird. Die angelockten Leukozyten interagieren zunächst, mit niedrigerer Affinität, mit Selektinen der Endothelzellen („rolling“), wodurch sie abgebremst werden und mit den Chemokinen in Kontakt kommen. Die Chemokine induzieren in den Leukozyten Integrine, die zu einer festeren Bindung der Leukozyten an Adhäsionsmoleküle

auf den Endothelzellen befähigen. Nur wenige Chemokine sind in der Lage, diese Integrine in der sehr kurzen Zeit von wenigen Sekunden zu induzieren, unter anderem SDF-1, der Ligand von CXCR4. Dann erfolgt die Diapedese (Luster, 1998; Campbell et al., 1998). Der 'Duffy antigen receptor for chemokines' (DARC) auf Erythrozyten, der, wie gesagt, keine signaltransduzierende Funktion besitzt, dient vermutlich als eine Art Auffangbecken für Chemokine, die aus der Blutzirkulation entfernt werden, um den Gradienten aufrecht zu erhalten (Luster, 1998).

Chemokine induzieren darüber hinaus durch die Aktivierung von Leukozyten die Produktion von bakteriziden Sauerstoffradikalen, bioaktiven Lipiden und auch das Freisetzen zytoplasmatischer Granula, wie zum Beispiel Proteasen von Neutrophilen und Monozyten, Histamin von Basophilen und zytotoxische Proteine von Eosinophilen (Baggiolini et al., 1994; 1997).

Die meisten Chemokine werden unter pathologischen Bedingungen von Gewebszellen und infiltrierenden Leukozyten gebildet (Baggiolini et al., 1994; Furie and Randolph, 1995). Die Expression von Chemokin-Rezeptoren wird von Zytokinen, wie IL-1 oder TNF- α , Lipopolysacchariden und verschiedenen anderen Stimuli wie viralen Infektionen reguliert (Baggiolini et al., 1994). Diese programmierte Expression spielt eine sehr wichtige Rolle dabei, sicher zu stellen, dass eine angemessene Immunantwort gegen ein spezielles Antigen eingeleitet wird. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Chemokin-Rezeptor-Expression und deren Assoziation mit Th1 und Th2 Phänotypen von Zytokinen reguliert wird. Beispielsweise hemmt IFN- α die CCR4-Expression, induziert jedoch CXCR3 und CCR1 (Sallusto et al., 1998). CXCR3 und CCR5 werden von Th1- Helferzellen exprimiert, CCR3, CCR4 und CCR8 dagegen werden eher von Th2- Helferzellen exprimiert (Bonecchi et al., 1998; Sallusto et al., 1997; Zingoni et al., 1998). Es wird vermutet, dass Chemokine auch bei der Differenzierung in entweder Th1- oder Th2-Zellen beteiligt sind und auch auf diese Weise eine Immunantwort zu dirigieren vermögen (Luster, 1998).

T-Zellen exprimieren im Ruhezustand fast nur CXCR4, nach Stimulation (mit IL-2) jedoch CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3 und nur noch wenig CXCR4 (Baggiolini 1998; Bonecchi et al., 1998; Luster, 1998; Sallusto et al., 1999), wobei die Expression von CXCR4 bei aktivierten Zellen sehr umstritten ist (siehe Diskussionsteil).

Es ist durchaus denkbar, dass Chemokin-Rezeptoren bald zur näheren Klassifizierung von T-Lymphozyten verwendet werden (Bonecchi et al., 1998).

Aktivierte T-Zellen sezernieren an Chemokinen IL-8 (Ligand von CXCR1 und 2), MIP-1 α , MIP-1 β , Lymphotactin und RANTES (Ward and Westwick, 1998).

Chemokine und ihre Rezeptoren sind außer den genannten Funktionen an einer Reihe anderer Vorgänge im Körper beteiligt, so zum Beispiel spielen sie eine wichtige Rolle bei der HIV-Infektion (siehe unten) und in der Tumorgenese. Es wurde beispielsweise für IP10, einem Liganden von CXCR3, gezeigt, dass es Neovaskularisation, Tumorwachstum und Metastasenbildung hemmen kann (Luster et al., 1995; Luster and Leder, 1993; Strieter et al., 1995).

In den nächsten Jahren werden voraussichtlich noch weitere Chemokine und Chemokin-Rezeptoren entdeckt werden, genauso wie bislang unbekannte Funktionen.

1.3.2. CXCR3 (CXC-Rezeptor-3) und seine Liganden

Der humane CXCR3-Rezeptor ist zu 40% mit dem IL-8 Rezeptor identisch. CXCR3 wird stark auf IL-2-aktivierten T-Lymphozyten exprimiert, ist aber nur sehr gering auf ruhenden T-Zellen, B-Zellen und Natürlichen Killerzellen und gar nicht auf Monozyten oder Granulozyten detektierbar (Qin et al., 1998). Diese Besonderheit dieses Rezeptors, nur auf T-Zellen exprimiert zu werden, - im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren, die ebenso auf T-Zellen exprimiert werden, aber auch auf Monozyten und Granulozyten, - läßt vermuten, dass CXCR3 für eine selektive Rekrutierung von Effektor-T-Zellen verantwortlich ist. Diese Besonderheit liegt darin begründet, dass die Liganden selektiv für aktivierte T-Lymphozyten sind (Loetscher et al., 1996 b).

Es sind bislang 3 Liganden für CXCR3 gefunden worden:

- IP10 (interferon-inducible protein of 10kD) = CXCL10
- MIG (monokine induced by interferon- γ) = CXCL9
- I-TAC (interferon-inducible T cell alpha chemoattractant) = CXCL11.

Die Produktion von IP10 und MIG wird durch IFN- γ induziert, das die Expression der meisten anderen Chemokine hemmt. Diese Eigenschaft ist ein weiteres Element für die Selektivität (Baggiolini et al., 1994) und ein weiterer Beleg dafür, dass CXCR3+ Zellen an Th1-Immunantworten beteiligt sind (Bonecchi et al., 1998).

Immunhistologische Färbungen bei Untersuchungen von entzündlichen Läsionen bei der Rheumatoiden Arthritis ergaben, dass praktisch alle T-Zellen in den Läsionen CXCR3 exprimierten, insbesondere in perivaskulären Regionen, wohingegen sehr viel weniger T-Zellen in normalen Lymphknoten CXCR3 exprimierten (Qin et al., 1998). Diese Ergebnisse zeigen, dass CXCR3 ein Marker für T-Zellen ist, die an bestimmten entzündlichen Reaktionen beteiligt sind.

Untersuchungen von Organtransplantat-Abstoßungen zeigten, dass CXCR3-Knock-out Mäuse ein signifikant verlängertes Transplantatüberleben aufwiesen, was darauf hindeutet, dass CXCR3 auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Abstoßungsreaktion spielt.

1.3.3. CXCR4 und sein Ligand SDF-1

Das Gen für CXCR4 wurde auf Chromosom 2 lokalisiert. Der Rezeptor ist höchst konserviert bei Vergleichen zwischen verschiedenen Spezies (Horuk, 2001). CXCR4 wird fast ubiquitär auf vielen verschiedenen Zelltypen, unter anderem auf den meisten Zellen der Hämatopoese, exprimiert (Bleul et al., 1997), aber nicht auf Neutrophilen (Bleul et al., 1997). Außerdem findet man CXCR4 auf vaskulären Endothelzellen (Gupta et al., 1998), Neuronen (Hesselgesser et al., 1997), Mikroglia und Astrozyten (He et al., 1997).

SDF-1 (stromal-cell derived factor-1) ist der Ligand für CXCR4. SDF-1 wird als einziges CXC-Chemokin auf Chromosom 10 kodiert, während alle anderen CXC-Chemokine auf Chromosom 4 lokalisiert sind. SDF-1 wurde zunächst als Wachstumsfaktor für B-Lymphozyt-Präkursor Zellen beschrieben (Nagasawa et al., 1991). SDF-1 von Mäusen, das sich von dem des Menschen nur in einer Aminosäure unterscheidet, zieht ruhende T-Lymphozyten *in vitro* und *in vivo* mit ungewöhnlich hoher Wirkung an (Bleul et al., 1996 a).

CXCR4 hat eine wichtige Funktion bei der embryonalen Reifung des Immunsystems und des Kreislaufsystems, wie Experimente an SDF-1- Knock-out Mäusen zeigten, die *in utero* aufgrund schwerer Entwicklungsfehler verstarben (Nagasawa et al., 1996; Zou et al., 1998).

Ein Symptom dieser Mäuse war, dass sie abnormal niedrige Zahlen an B-Lymphozyten und myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark aufwiesen (Nagasawa et al., 1996). Es wurde deswegen vermutet, dass SDF-1 ein wichtiger chemotaktischer Faktor für B-Zell-Vorläuferzellen im Knochenmark ist, wo die Reifung und Differenzierung der B-Zellen stattfindet (D'Apuzzo et al., 1997). Es konnte aber gezeigt werden, dass CXCR4 auch auf anderen Vorläuferzellen in der Hämatopoese exprimiert wird (Aiuti et al., 1997).

So spielen CXCR4/SDF-1 auch eine wichtige Rolle bei der T-Zellentwicklung und beim T-Zelltrafficking. CXCR4 wird in hoher Zahl auf doppelt-positiven Thymozyten exprimiert, im Thymus im Zuge der Reifung zu einfach-positiven Thymozyten herunterreguliert und wieder vermehrt exprimiert, wenn die Thymozyten den Thymus verlassen (Suzuki et al., 1998). Die hohe Zahl an

CXCR4 der Vorläuferzellen wird benötigt, um sie aus dem peripheren Blut in den Thymus für die weitere Reifung zu dirigieren. Nach der Reifung zu einfach-positiven Thymozyten müssen die CXCR4-Rezeptoren herunterreguliert werden, damit die Zellen den Thymus verlassen können. Analog wurde von Gazitt gezeigt, dass eine Herunterregulierung von CXCR4 auf CD34+ Zellen stattfinden muss, damit sie das Knochenmark verlassen können (Gazitt, 2000). In der Peripherie werden die Rezeptoren für das Homing zu den peripheren lymphatischen Geweben (Lymphknoten) wieder hochreguliert.

Experimente an Wildtyp- und Knockout-Mäusen zeigten, dass CXCR4-Transkripte auch schon früh in der Embryogenese im ZNS gefunden werden. Somit spielt CXCR4 sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des ZNS (Jazin et al., 1997).

CXCR4 wurde zum Gegenstand intensiver Forschungen als man herausfand, dass dieser Rezeptor ein HIV-1 Corezeptor ist, der von T-tropischen (T-Zell – tropisch) HIV-1 strains für den zellulären Eintritt gebraucht wird (Feng et al., 1996). Experimente konnten zeigen, dass der physiologische Ligand SDF-1 den Eintritt der T-tropischen HI-Viren blockieren konnte (Bleul et al., 1996 b), genauso wie die Liganden von CCR5, dem zweiten bedeutenden HIV-assoziierten Chemokin-Rezeptor, den Eintritt der M-tropischen Viren (Makrophagen-topisch) in die Zelle verhindern können (Cocchi et al., 1995).

1.3.4. Die Rolle der Chemokin-Rezeptoren bei der MS

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass CCR1 eine Rolle bei der Pathophysiologie der MS spielt. Rattenexperimente mit dem CCR1-Antagonisten BX 471 zeigten, dass dieser Antagonist den klinischen Score um ca. 50% reduzieren konnte (Liang et al., 2000). Experimente mit CCR1-Knockout Mäusen zeigten, dass diese Mäuse eine signifikant niedrigere Inzidenz einer EAE-Erkrankung aufwiesen (Rottmann et al., 2000).

Auch bei CCR2 konnte in einigen Untersuchungen gezeigt werden, dass dieser Rezeptor wahrscheinlich an der Pathogenese der MS beteiligt ist. CCR2-Knockout Mäuse entwickelten in Experimenten keine klinische EAE oder ZNS Histopathologie und zeigten eine signifikant niedrigere T-Zell- und Makrophagen-Infiltration des ZNS (Fife et al., 2000; Izikson et al., 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass EAE-Induktion bei Ratten von einer erhöhten Expression von CCR2 begleitet ist (Jiang et al., 1998).

CCR1 und CCR2 werden auf Makrophagen konstitutiv exprimiert, auf Lymphozyten jedoch erst nach Stimulation mit IL-2 (Loetscher et al., 1996 a). Simpson et al. entdeckten in Untersuchungen an post mortem Hirnschnitten von MS-Patienten und Kontrollen, dass CCR2, CCR3 und CCR5 in chronisch aktiven Läsionen von MS-Patienten in erhöhter Zahl vorkamen. Die Rezeptoren waren dabei hauptsächlich mit Schaumzellen und aktivierten Mikrogliazellen assoziiert und nicht so sehr mit T-Zellen (Simpson et al., 2000a).

Es konnte gezeigt werden, dass MIP-1 α und RANTES, beides Rezeptoren für CCR1 und CCR5, von perivaskulären, inflammatorischen Zellen exprimiert werden (Miyagishi et al., 1997).

MIP-1 α , ein Ligand für die Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5, wurde in niedrigen Mengen im Liquor von MS-Patienten gefunden, nicht aber bei Gesunden (Miyagishi et al., 1995). Der Liquor ist im Gleichgewicht mit dem Extrazellularraum des ZNS und vom systemischen Blutkreislauf durch die Blut-Liquor-Schranke getrennt (Ransohoff, 2002).

Karpus and Kennedy zeigten, dass Antikörper gegen MIP-1 α initiale Attacken der EAE durch adoptiven Transfer unterdrücken konnten, während Antikörper gegen MCP-1 (Ligand für CCR2) nachfolgende Schübe verhinderte, was darauf hindeutet, dass mehrere Chemokinrezeptoren in der Pathogenese beteiligt sind und unterschiedliche Aufgaben übernehmen (Karpus and Kennedy, 1997).

Die wohl bedeutendsten und in den letzten Jahren am meisten erforschten Chemokinrezeptoren sind CCR5 und CXCR3 mit ihren Liganden MIP-1 α und RANTES bzw. IP-10 und MIG.

Abgesehen von den bereits genannten Untersuchungen gibt es weitere Ergebnisse, die belegen, dass eine Beteiligung von CCR5 an der Pathogenese der MS wahrscheinlich ist. Zum Beispiel, dass MS Patienten, die eine Mutation am Genlocus von CCR5 haben (CCR5 Δ 32) und damit sozusagen Knock-out Patienten für diesen Rezeptor sind, zwar keinen signifikant erhöhten Schutz vor der Initialphase der Erkrankung besitzen, aber ein niedrigeres Risiko für einen chronisch schubförmigen Verlauf haben (Sellebjerg et al., 2000). Eine andere Studie zeigte, dass bei einer Interferon- β Behandlung von Patienten eine Verbesserung der Symptomatik mit einer Reduktion der CCR5-Expression auf T-Zellen positiv korreliert ist (Zang et al., 2001).

1.3.5. CXCR3 und Multiple Sklerose

Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass T-Zellen von MS-Patienten im Liquor gegenüber peripherem Blut mehr CCR5 und CXCR3 exprimieren (Misu et al., 2001; Sindern et al., 2002, Sörensen et al., 1999, 2002; Teleshova et al., 2002). Andere Chemokinrezeptoren waren dagegen im Liquor nicht erhöht, bis auf CCR1, der eine leicht höhere Expression aufwies, aber dennoch nur auf einem kleinen Anteil der T-Zellen zu detektieren war (Kivisäkk et al., 2002; Misu et al., 2001). Kivisäkk et al. konnten jedoch zeigen,

dass auch Kontrollpersonen, die nicht an MS erkrankt sind, in gleichem Maße eine erhöhte Expression von CXCR3 und CCR5 im Liquor aufwiesen (Kivisäkk et al., 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen im Liquor mehrheitlich dem Memory/Effektor-Zelltyp angehörten, was belegt, dass aktivierte Zellen mehr CXCR3 exprimieren und dadurch konnte auch die Überlegung gestützt werden, dass die CXCR3- und evtl. auch die CCR5-Expression eine Voraussetzung dafür sind, dass aktivierte T-Zellen ins ZNS einwandern können (Kivisäkk et al., 2002; Teleshova et al., 2002).

Interessanterweise konnten Kivisäkk et al. bei ihren Untersuchungen auch zeigen, dass CXCR3 im Vergleich zu CCR5 sehr wahrscheinlich der wichtigere Chemokinrezeptor für das Trafficking ins ZNS ist, da CXCR3 auf einer deutlich höheren Zellzahl zu detektieren war und es praktisch keine CXCR3 – /CCR5 + T-Zellen im Liquor gab (Kivisäkk et al., 2002).

Liquor-Untersuchungen bei Patienten mit akuter MS ergaben, dass die Konzentration von CXCL10 (=IP10), einem Ligand von CXCR3, der durch IFN- γ induzierbar ist, zehn mal höher als im Blut (Sindern et al., 2002) und deutlich höher als bei Kontrollpersonen ist (Franciotta et al., 2001). Sörensen et al. konnten diesen Befund in ihren Untersuchungen bestätigen und zeigten darüber hinaus, dass eine Methylprednisolon-Therapie diese hohen IP-10-Werte nicht beeinflusste (Sörensen et al., 2002). Bereits zuvor konnten Misu et al. zeigen, dass eine Therapie zwar die Zahl der CCR5+ Zellen im Liquor senken konnte, nicht jedoch die Zahl der CXCR3+ Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass CCR5 wichtig für die Initiierung der Inflammation sei und als Marker für Schübe bzw. Remission verwendet werden kann, während CXCR3 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunantwort spielt (Misu et al., 2001).

Neben Untersuchungen von PBMC aus Liquor und peripherem Blut wurden in mehreren Studien Hirnschnitte von verstorbenen MS-Patienten und MRT-Bilder untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse deuten sehr stark darauf hin, dass

CXCR3 eine bedeutende Rolle bei der MS spielt. So ergaben Untersuchungen von aktiven MS-Läsionen, dass IP-10 auf Astrozyten in der Umgebung der Läsionen exprimiert wird, nicht jedoch in nicht betroffener weißer Substanz (Balashov et al., 1998). Simpson et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass MIG und IP-10 in aktiv demyelinisierenden Läsionen vorwiegend von Makrophagen und reaktiven Astrozyten im umliegenden Parenchym exprimiert werden, und dass CXCR3 von T-Zellen in den Plaques und von Astrozyten exprimiert wird (Simpson et al., 2000 b).

Sörensen et al. kamen bei ihren Untersuchungen von MS-Läsionen zu einigen interessanten Ergebnissen. Sie konnten zum einen zeigen, dass ältere aktive Läsionen signifikant mehr CXCR3 enthielten als neuere aktive Läsionen, was darauf hindeutet, dass kontinuierlich weiter CXCR3-positive T-Zellen in die Läsion einströmen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine hohe Korrelation zwischen IP-10 und CXCR3 in den Läsionen besteht. Sie konnten auch zeigen, dass praktisch alle T-Zellen in den perivaskulären entzündlichen Infiltraten CXCR3-positiv sind. CXCR3-positive Zellen wurden im ZNS gesunder Kontrollen dagegen fast nie gefunden, genauso wenig wie IP-10 (Sörensen et al., 2002).

Die Bedeutung von CXCR3 wurde auch dadurch unterstrichen, dass durch MRT-Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass Patienten mit aktiven Läsionen einen signifikant höheren Anteil an CXCR3-positiven Zellen hatten als Patienten ohne Gd-anreichernde Läsionen (Sindern et al., 2002).

Auch einige Untersuchungen am EAE-Modell untermauern die Rolle von CXCR3 bei der Pathogenese der MS. So konnte beispielsweise in Tierexperimenten gezeigt werden, dass IP-10 antisense Mäuse vor EAE schützt (Wojcik et al., 1996). In anderen Experimenten wurden Antikörper gegen IP-10 eingesetzt, die sowohl die Inzidenz und Schwere der EAE, als auch den Einstrom mononukleärer Zellen ins ZNS verringern konnten (Fife et al., 2001). Auch Antikörper gegen CXCR3 bei EAE-sensiblen Mäusen konnten die Erkrankung verhindern (Arimilli et al., 2000) bzw. das Recruitment von Th1 Zellen zu Orten der Inflammation (Xie et al., 2003).

1.3.6. CXCR4 und Multiple Sklerose

Die Rolle von CXCR4 bei chronischen, entzündlichen Erkrankungen wurde bislang noch nicht untersucht. Fast alle wissenschaftlichen Veröffentlichungen untersuchten die Rolle von CXCR4 bei der HIV-Infektion. Es wird auch von vielen Autoren davon ausgegangen, dass CXCR4 entweder keine besondere immunologische Relevanz besitzt oder dass CXCR4, da es auf so vielen Gewebezellen exprimiert wird, nur für die Homöostase bzw. das Homing von Zellen verantwortlich ist (Sallusto et al., 1999).

1.4. Die Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit

1. Nachdem Gene-Chip Untersuchungen bei LEW.1AV1 Ratten, die an EAE erkrankt waren, und Kontrollen ergaben, dass CXCR4-mRNA Werte bei den EAE-Ratten gegenüber den Kontrollen erhöht waren (eigene unveröffentlichte Ergebnisse), wurden in dieser Arbeit mononukleäre Zellen (PBMC) aus venösem peripherem Blut von MS-Patienten und Kontrollpersonen isoliert, um zu untersuchen, ob dieser Unterschied auch beim Menschen zu beobachten ist. Dazu wurde die Expression von CXCR4 auf mRNA- und Proteinebene bei beiden Gruppen gemessen und verglichen.
2. Zur gleichen Zeit wurde auch bei den gleichen Patienten und Kontrollen die Expression des CXCR3-Chemokinrezeptors auf mRNA- und Proteinebene in nativen PBMC bestimmt, d. h. eines Rezeptors, von dem bereits bekannt war, dass er sehr wahrscheinlich an der Pathogenese der MS beteiligt ist. Dies diente zum einen der Gewinnung unabhängiger Ergebnisse bei CXCR3, aber auch dem Vergleich dieser beiden Rezeptoren.
3. Darüber hinaus wurden die MS-Patienten nach ihrem Krankheitsverlauf in Gruppen mit schubförmigem und chronisch-progredientem Verlauf eingeteilt und diese beiden Gruppen auf Unterschiede in der Expression bei beiden Rezeptoren untersucht.

4. Außerdem wurde untersucht, ob eine Stimulation der PBMC mit autoantigenen Myelinproteinen in Zellkultur die Expression von CXCR3 und CXCR4 induzieren kann. Stimuliert wurde mit den kürzeren MOG-Peptiden 91-108, 93-108, 141-156 und 146-154, die sich in früheren Studien als immundominante Epitope erwiesen (siehe auch Kap. 1.2.4.3.), dem extrazellulären Teil von MOG (1-125) und dem vollständigen MOG-Protein (1-218). Darüber hinaus mit MBP 83-99, dem immundominanten Epitop des MBP-Moleküls. Als Kontrollen wurde mit Influenza-A-Peptid und PHA stimuliert.

5. Abgesehen von der Untersuchung unstimulierter PBMC von Patienten und Kontrollen, wurden die stimulierten PBMC dieser beiden Gruppen miteinander verglichen und auch Patienten mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf untereinander, um zu sehen, ob die Patientengruppe eine höhere (oder evtl. auch niedrigere) Reaktivität gegenüber den Antigenen aufweist.

6. Außerdem sollte, im Falle einer Induktion durch die genannten Antigene, untersucht werden, welche Antigene die größten Reaktionen hervorrufen konnten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur

2.1.1.1. Probanden

20 Patienten der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen mit Multipler Sklerose sowie 16 gesunde Kontrollpersonen willigten einer Blutentnahme für wissenschaftliche Zwecke zu. Die Patienten konnten zusätzlich nach ihrem Krankheitsverlauf in 3 Gruppen unterteilt werden. 11 Patienten hatten einen schubförmigen Verlauf, 2 Patienten hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen Schub und 6 Patienten hatten einen sekundär chronisch progredienten Krankheitsverlauf.

Das mittlere Alter der MS Patienten betrug 37 +/-10 Jahre und das der Kontrollen 38 +/-14 Jahre, mit einer Geschlechtsverteilung von männlich zu weiblich bei den MS Patienten von 15:85 %, bei den Kontrollen von 31:69 %.

2.1.1.2. Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC) aus Vollblut

a) Geräte und Einwegmaterialien

Sterilbank	(NUAIRE)
Zentrifuge (Rotanta RPC)	(HETTICH)
10 ml Monovetten	(SARSTEDT)

sterile Plastikpasteurpipetten	(GREINER)
Pipettierhilfe Accu-Jet	(BRAND)
2 ml Sterilpipetten, wattiert	(FALCON)
50 ml Schraubdeckelröhrchen	(FALCON)

b) Chemikalien und Lösungen

PBS (phosphate buffered saline, pH 7,2)	(GIBCO)
Lymphoprep	(AMERSHAM)

2.1.1.3. **Zellfärbung und Zellzahlbestimmung**

a) Geräte und Einwegmaterialien

Lichtmikroskop	(LEICA)
Neubauer-Zahlkammer	(EPPENDORF-NETHELER-HINZ)

b) Chemikalien und Lösungen

Trypan-Blau-Lösung	(SIGMA)
(0,9 g NaCl + 0,5 g Trypanblau ad 100 ml H ₂ O entionisiert, 0,45 µm- Filter sterilfiltriert)	

2.1.1.4. **Allgemeine Zellkultur**

a) Geräte und Einwegmaterialien

Sterilbank	(NUAIRE)
Inkubator	(NUAIRE)
Zentrifuge (Rotanta RPC)	(HETTICH)
Schüttler Vortex Genie 2	(NEOLAB)
Pipettierhilfe Accu-Jet	(BRAND)
5 ml Sterilpipetten, wattiert	(FALCON)
10 ml Sterilpipetten, wattiert	(FALCON)
25 ml Sterilpipetten, wattiert	(FALCON)
Multipipette	(EPPENDORF-NETHELER-HINZ)
Combitips (100-500 µl)	(BRAND)
96 MicroWell-Platten	(NUNC)
Cellstar 24 Loch-Platten	(GREINER)
Pipetten	(GILSON)

b) Chemikalien und Lösungen

Kulturmedium (CM)	
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 500 ml)	(GIBCO)
- L-Glutamin (4 mM)	(GIBCO)
- Penicillin (100 U/ml)	(GIBCO)
- Streptomycin (100 µg/ml)	(GIBCO)
- 5% FCS (fetales Kälberserum)	(PAA Laboratories)

b) Chemikalien und Lösungen

RNeasy Kit	(QUIAGEN)
- RLT-Puffer	
- RW1-Puffer	
- RPE-Puffer	
- RNase-freies H ₂ O	
DNase Kit	(QUIAGEN)
- DNase	
- RDD-Puffer	
Ethanol (70%ig)	(MERCK)

2.1.2.2. **Transkription der RNA in cDNA**

a) Geräte und Einwegmaterialien

Wasserbad	
Heizblock	(NEOLAB)
Pipetten	(GILSON)
Eppendorf-Gefäße	(EPPENDORF)

b) Chemikalien und Lösungen

Random Hexamere	(AMMERSHAM PHARMACIA)
RT-Mastermix (26.5 µl pro Ansatz)	
- 5x RT-Puffer (10 µl)	(PROMEGA)
- dNTPs 10mM (10 µl)	(PROMEGA)
- RNase Inhibitor 40 U/µl (0,25 µl)	(PROMEGA)
- M-MLV RT 200 U/µl (1 µl)	(PROMEGA)
- H ₂ O _{DEPC} (RNase frei) (5,25 µl)	

2.1.2.3. TaqMan-PCR Reaktion

a) Geräte und Einwegmaterialien

TaqMan-Gerät ABI PRISM [®] SDS	(PERKIN ELMER/ABI)
TaqMan 96-well-Platten	(GENESCAN)
Pipetten	(GILSON)

b) Chemikalien und Lösungen

SYBR Green PCR Master Mix	(APPLIED BIOSYSTEMS)
(hot-start-AmpliTaqGold [®] , 2x SYBR [®] Green PCR Puffer, MgCl ₂ , dNTPs)	
Primer (siehe unten)	(GENESCAN)

TaqMan Mastermix	1.000µl
- SYBR Green PCR MM	750µl
- forward primer	80µl
- reverse primer	80µl
- H ₂ O _{dd}	90µl

2.1.2.4. Primer

I) CXCR3

Sequenz:

69 AT GGTCTTGAG GTGAGTGACC ACCAAGTGCT AAATGACGCC GAGGTTGCCG
 121 CCCTCCTGGA GAACCTCAGC TTTCTATG ACTATGGAGA AAACGAGAGT GACTCGTGCT
 181 GTACCTCCCC GCCCTGCCCA CAGGACTTCA GCCTGAACTT CGACCGGGCC TTCCTGCCAG
 241 CCCTCTACAG CCTCCTCTTT CTGCTGGGGC TGCTGGGCAA CGGCGCGGTG GCAGCCGTGC
 301 TGCTGAGCCG GCGGACAGCC CTGAGCAGCA CCGACACCTT CCTGCTCCAC CTAGCTGTAG
 361 CAGACACGCT GCTGGTGCTG AACTGCCGC TCTGGGCAGT GGACGCTGCC GTCCAGTGGG
 421 TCTTTGGCTC TGGCCTCTGC AAAGTGGCAG GTGCCCTCTT CAACATCAAC TTCTACGCAG
 481 GAGCCCTCCT GCTGGCCTGC ATCAGCTTTG ACCGCTACCT GAACATAGTT CATGCCACCC
 541 AGCTCTACCG CCGGGGGCCC CCGGCCCGCG TGACCCTCAC CTGCCTGGCT GTCTGGGGG
 601 TCTGCCTGCT TTTGCCCCTC CCAGACTTCA TCTTCTGTC GGCCACCAC GACGAGCGCC
 661 TCAACGCC**CAC CCACTGCCAA TACAATTCC CACAGGTGGG CCGCACGGCT CTGCGGGTGC**
 721 **TGCAGCTGGT GGCTGGCTTT CTGCTGCCCC TGCTGGTCAT GGCCTACTGC TATGCCACA**
 781 TCCTGGCCGT GCTGCTGGTT TCCAGGGGCC AGCGGCGCCT GCGGGCCATG CCGCTGGTGG
 841 TGGTGGTCGT GGTGGCCTTT GCCCTCTGCT GGACCCCTA TCACCTGGTG GTGCTGGTGG
 901 ACATCCTCAT GGACCTGGGC GCTTTGGCCC GCAACTGTGG CCGAGAAAGC AGGGTAGACG
 961 TGGCCAAGTC GGTCACCTCA GGCCTGGGCT ACATGCACTG CTGCCTCAAC CCGCTGCTCT
 1021 ATGCCTTTGT AGGGGTCAAG TTCCGGGAGC GGATGTGGAT GCTGCTCTTG CGCCTGGGCT
 1081 GCCCAACCA GAGAGGGCTC CAGAGGCAGC CATCGTCTTC CCGCCGGGAT TCATCCTGGT
 1141 CTGAGACCTC AGAGGCCTCC TACTCGGGCT TGTGA 1175

	Forward	Reverse	Exon-Exon Overlap	Amplicon Sequence	Product size
CXCR3	CACCCACTGCCAATACA CT	TAGCAGTAGGCCATGAC CAG	no	FOR: CACCCACTGCCAATACAAC TTCCACAGGTGGGCCGCA CGGCTCTGCGGGTGTGCA GCTGGTGGCTGGCTTTCTG CTGCCCTGCTGGTCATGG CCTACTGCTA REV: TAGCAGTAGGCCATGACCA GCAGGGGCAGCAGAAAGC CAGCCACCAGCTGCAGCAC CCGAGAGCCGTGCGGCC CACCTGTGGGAAGTTGTAT TGGCAGTGGGTG	105

$$\text{CXCR3.1 } y = -3,744x + 19 \quad E=1,85$$

II) CXCR4

Sequenz:

EXON1 : G TTTGTTGGCT
 961 GCGGCAGCAG GTAGCAAAGT GACGCCGAGG GCCTGAGTGC TCCAGTAGCC ACCGCATCTG
 1021 GAGAACCAGC GGTTACCATG GAGGGGATCA GTATATAC ACTTCAGATA ACTACACCGA
 GGAAATGGGC TCAGGGGACT ATGACTCCAT

EXON 2:
 3301 CTACTCCATC ATCTTCTTAA CTGGCATTGT GGGCAATGGA TTGGTCATCC TGGTCATGGG
 3361 TTACCAGAAG AACTGAGAA GCATGACGGA CAAGTACAGG CTGCACCTGT CAGTGGCCGA
 3421 CCTCCTCTTT GTCATCACGC TTCCCTTCTG GGCAGTTGAT GCCGTGGCAA ACTGGTACTT
 3481 TGGGAACCTC CTATGCAAGG CAGTCCATGT CATCTACACA GTCAACCTCT ACAGCAGTGT
 3541 CCTCATCCTG GCCTT**CATCA GTCTGGACCG CTACCTGGCC ATCGTCCACG CCACCAACAG**
3601 TCAGAGGCCA AGGAAGCTGT TGGCTGAAAA GGTGGTCTAT GTTGGCGTCT GGATCCCTGC
 3661 CCTCCTGCTG ACTATTCCCG ACTTCATCTT TGCCAACGTC AGTGAGGCAG ATGACAGATA
 3721 TATCTGTGAC CGCTTCTACC CCAATGACTT GTGGGTGGTT GTGTTCCAGT TTCAGCACAT
 3781 CATGGTTGGC CTTATCCTGC CTGGTATTGT CATCCTGTCC TGCTATTGCA TTATCATCTC
 3841 CAAGCTGTCA CACTCCAAGG GCCACCAGAA GCGCAAGGCC CTCAGACCA CAGTCATCCT
 3901 CATCCTGGCT TTCTTCGCCT GTTGGCTGCC TTACTIONATT GGGATCAGCA TCGACTCCTT
 3961 CATCCTCCTG GAAATCATCA AGCAAGGGTG TGAGTTTGAG AACACTGTGC ACAAGTGGAT
 4021 TTCCATCACC GAGGCCCTAG CTTTCTTCCA CTGTTGTCTG AACCCCATCC TCTATGCTTT
 4081 CCTTGGAGCC AAATTTAAAA CCTCTGCCCA GCACGCACCTC ACCTCTGTGA GCAGAGGGTC
 4141 CAGCCTCAAG ATCCTCTCCA AAGGAAAGCG AGGTGGACAT TCATCTGTTT CCACTGAGTC
 4201 TGAGTCTTCA AGTTTTCACT CCAGCTAA

	Forward	Reverse	Exon-Exon Overlap	Amplicon Sequence	Product size
CXCR4	CATCAGTCTGGACCGCTACC	GGATCCAGACGCCAACATAG	no	FWD: CATCAGTCTGGACCGCTACC CTGGCCATCGTCCACGCCA CCAACAGTCAGAGGCCAAG GAAGCTGTTGGCTGAAAAG GTGGTCTATGTTGGCGTCT GGATCC REV: GGATCCAGACGCCAACATA GACCACCTTTTCAGCCAAC AGCTTCCTTGGCCTCTGAC TGTTGGTGGCGTGGACGAT GGCCAGGTAGCGGTCCAGA CTGAT	101 bp

$$\text{CXCR4 } y = -3,371x + 21,248$$

III) 18S

18S ist eine ribosomale RNA, die konstitutiv von allen Zellen des menschlichen Körpers gebildet wird. Das Gen, das für 18S kodiert, wird deswegen auch als Housekeeping Gene bezeichnet. In den TaqMan Versuchen wurde die Transkription von 18S als Referenz genommen.

2.1.3. Durchflußzytometrie (FACS)

a) Geräte und Einwegmaterialien

Durchflußzytometer (FACScalibur)	(BECTON DICKINSON)
1 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol	(FALCON)
Mehrkanalpipette	(BRAND)
Pipetten	(GILSON)
Zentrifuge (Rotanta RPC)	(HETTICH)

b) Chemikalien und Lösungen

FACS-Puffer

- PBS (pH 7,2)	(GIBCO)
- BSA (bovines Serumalbumin) 0,1 %	(SIGMA)
- Natriumazid NaN_3 0,1 %	(CARL ROTH)

Blockungs-Puffer

PE-markierte Antikörper	(PHARMINGEN)
-------------------------	--------------

2.2. Methoden

2.2.1. Vorbereitung der PBMC Zellkultur

2.2.1.1. Isolierung mononuklearer Zellen (PBMCs) aus Vollblut

a) Prinzip

Mit Hilfe der Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation können die zellulären Blutbestandteile nach ihrer Dichte getrennt werden.

Die PBMCs und Thrombozyten bleiben aufgrund ihrer geringeren Dichte oberhalb der Ficoll-Hypaque Schicht, während die Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Gefäßes sedimentieren. Die PBMCs können nun abpipettiert werden. Durch zwei folgende Waschschrte wird erreicht, dass die Thrombozyten und das Ficoll (Lymphoprep) weitestgehend beseitigt werden.

b) Methode

Die heparinisierten Blutproben wurden in 50 ml Schraubdeckelröhrchen mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt. Dann wurden 2 Volumina dieses Blut-PBS-Gemisches vorsichtig auf 1 Volumen Ficoll (Lymphoprep) überschichtet. Danach folgte die Dichtezentrifugation bei 2000 U/min (900g) für 25 Minuten bei 20°C ohne Bremse, durch die sich die PBMCs deutlich sichtbar in der Interphase ansammelten und von den Erythrozyten und Granulozyten trennten. Diese Zellschicht wurde entweder mit sterilen Plastikpasteurpipetten oder mit Hilfe des Accu-Jet[®] und steriler 2 ml-Plastikpipetten entnommen. Die Zellen wurden in 50 ml Schraubdeckelröhrchen gegeben, mit PBS aufgefüllt und für 10 Minuten mit 1000 U/min (400g) zentrifugiert. Dieser Waschschrte wurde wiederholt und die Zellen anschließend in Kulturmedium resuspendiert. Dann wurde die Zellzahlbestimmung durchgeführt.

2.2.1.2. Zellfärbung und Zellzahlbestimmung

a) Prinzip

Die Zellen werden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. In deren Vertiefung wird bei aufgelegtem Deckglas ein definiertes Volumen von 0,1 µl pro Eckquadrat, bestehend aus 16 kleineren Quadraten, umschlossen.

Vor der Zählung werden die Zellen mit Trypan-Blau angefärbt. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und erscheinen unter dem Lichtmikroskop hell, während tote Zellen mit dem Farbstoff gefüllt sind und als blauschwarze Punkte sichtbar werden.

b) Methode

10 µl Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypan-Blau gemischt und wiederum 10 µl dieses Gemisches auf die mit einem Deckglas bedeckte Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden 16 Quadrate ausgezählt, was einem Eckquadrat entspricht, und die Zellzahlkonzentration nach folgender Formel berechnet:

Zellzahl / ml = Anzahl der Zellen in den 16 Quadraten x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10.000 (Volumenfaktor eines Eckquadrats).

2.2.2. TaqMan-PCR

2.2.2.1. Zellkultur für TaqMan-PCR

Die aus 2.2.1. gewonnenen PBMC wurden auf eine Konzentration von 1 Mio Zellen / ml mit CM verdünnt und jeweils 200 µl dieser Zelllösung auf 96-Loch-Platten pipettiert. Diese Zellen wurden mit 20 µl verschiedener Antigene in einer Endkonzentration von 10 µg/ml, jeweils in Triplikaten, für die Zellkultur inkubiert. Für den TaqMan-PCR Ansatz wurden die Antigene MOG 91-108, MOG 93-108, MOG 141-156, MOG 146-154, MOG 1-125, MOG 1-218, Influenza A, MBP 83-99, PHA und eine Medium-Kontrolle (= kein-Antigen Kontrolle) verwendet und außerdem native PBMC untersucht, die – ebenso ohne ein Antigen stimuliert – ohne Inkubationszeit gleich weiterverarbeitet wurde, also die reine Zelllösung.

2.2.2.2. Isolierung der RNA aus den Zellen nach Zellkultur

Um eine Kontaminierung mit RNAsen zu verhindern, wurde bei allen Arbeitsschritten mit RNA autoklaviertes Material und Handschuhe verwendet und auf Eis gearbeitet.

Für die „nativen PBMC“ Proben wurde 1 ml der Zelllösung direkt weiter behandelt; die restlichen Proben auf der 96-Loch-Platte wurden in den Inkubator gestellt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen entnommen und – genau so wie die „native PBMC“ Proben zuvor – in autoklavierte 1.5 ml Eppendorf Gefäße überführt, jeweils aus den drei Triplikat-Löchern einer 96-Loch-Platte in ein Gefäß, und in der Mikrozentrifuge bei 5000 U / min für 3 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 300 µl RLT- Lyse-puffer (enthält 10 µl/ml Mercaptoethanol) resuspendiert. Bei diesem Schritt werden die Zellen lysiert. Im nächsten Schritt wurde 300 µl 70%iges Ethanol dazugegeben und vorsichtig geschüttelt. Durch das Ethanol wird die RNA ausgefällt. Nun wurden diese 600 µl aus jedem Eppendorf Gefäß jeweils auf ein

RNA-Säulchen überführt. Die Filtrationen wurden stets beschleunigt durch zentrifugieren mit 10.000 U/min (8.000g) für 20 Sekunden in der Mikrozentrifuge. Das Filtrat wurde verworfen.

Es folgte ein erster Waschschrift. Auf jedes Säulchen wurde 300 µl RW1-Puffer pipettiert und anschließend wieder in der Zentrifuge filtriert.

Auf jedes Säulchen wurde dann 80 µl DNase Puffer (5 µl DNase + 75 µl Puffer) gegeben und für 15 min inkubiert. Durch diesen Schritt wird die DNA zerstört und die RNA bleibt als einzige Nukleinsäure erhalten.

Nach diesen 15 min wurde wieder mit 300 µl RW1-Puffer gewaschen.

Anschließend wurde zwei mal mit 400 µl RPE-Puffer (enthält Ethanol) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde mit 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit aus der Säule zu bekommen.

Im letzten Schritt wurde die RNA mit 100 µl RNase-freies Wasser aus den Säulchen eluiert und in jeweils einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen.

Die RNA wurde anschließend entweder bei -20°C eingefroren oder, auf Eis gelagert, gleich in cDNA umgeschrieben.

2.2.2.3. Reverse Transkription der RNA in cDNA

a) Prinzip

Die Reverse Transkription wird eingesetzt, um messenger RNA (mRNA) in komplementäre einzelsträngige cDNA (complementary) umzuschreiben. Dafür wird ein virales Enzym verwendet, die Reverse Transkriptase. Die vorliegende mRNA dient als Matrize, an die sich Oligonukleotidprimer anlagern. Von diesen Positionen aus wird die neue cDNA in 5'-3'- Richtung synthetisiert. Das Erhitzen der Proben nach Ende der Inkubationszeit dient der Inaktivierung der Reversen Transkriptase und der Trennung der mRNA-cDNA-Hybride

b) Methode

Im ersten Schritt wurden 21,5 µl jeder RNA-Probe zusammen mit 2 µl Random Hexameren in ein autoklaviertes Eppendorf Gefäß gegeben und in einem Heizblock bei 70°C für 10 min inkubiert, um die Sekundärstrukturen der Nucleinsäuren zu zerstören. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und jeweils 26.5 µl des RT-Mastermixes dazugegeben. Die Proben wurden mit einem Schüttler gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend für 50 min in einem Wasserbad bei 42°C und zuletzt 15 min bei 70°C im Heizblock. Die cDNA-Proben wurden dann bei -20°C eingefroren.

2.2.2.4. Durchführung der TaqMan-PCR

a) Prinzip

l) PCR allgemein

Mittels der Technik der PCR (polymerase chain reaction) werden cDNA Abschnitte spezifisch amplifiziert und die cDNA-Ausgangsmenge relativ oder absolut bestimmt. Damit ist es rückschließend möglich, DNATranskripte auf mRNA Ebene sehr sensitiv zu detektieren und zu quantifizieren, auch wenn sie nur in sehr geringer Anzahl vorliegen.

Der Ablauf der Polymerasenkettenreaktion entspricht der Replikation in der Zelle, d.h. eine Polymerase synthetisiert entlang einer Nucleinsäurematrix den dazu komplementären Strang.

Genauso wie bei der in vivo Replikation werden für die PCR außer Polymerase und Nucleotiden Primer als Startermoleküle benötigt, ein sense oder forward primer und ein antisense oder reverse primer. Die Primer flankieren ganz spezifisch den Bereich der cDNA, der amplifiziert (= Amplikon) und gemessen werden soll.

Die Primer werden anhand eines Primer Design Computerprogrammes so ausgewählt, dass möglichst ideale Werte in verschiedenen Kriterien, die die

Effizienz der Reaktion beeinflussen, gewährleistet sind. So sollen die Primer mindestens 18 und längstens 30 Nukleotide lang sein, das eingeschlossene Amplikon soll 100 – 150 Nukleotide groß sein und beide Primer sollen die gleiche Schmelztemperatur von ca. 60°C besitzen. Wenn möglich sollten die Primer eine Exon-Exon Schnittstelle überspannen, um eine Amplifizierung genomischer DNS, die bei einer Kontamination enthalten sein kann, zu verhindern.

Die Amplifizierung der cDNA erfolgt in mehreren Zyklen, wobei sich bei jedem Zyklus die cDNA-Menge verdoppelt. Ein Zyklus besteht aus zunächst der Hitzedenaturierung in Einzelstränge bei 90-95°C, dann Abkühlung auf auf 50-70°C wodurch es zur Anlagerung (Annealing) der Primer kommt und schließlich der Polymerisation (Extension) der komplementären Stränge bei ca 72°C.

Für die PCR wird die Taq-Polymerase verwendet, eine sehr hitzeresistente Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird, so daß mit einem Ansatz mehrere Reaktionszyklen durchgeführt werden können.

II) TaqMan-PCR

Die TaqMan PCR ist eine sehr sensitive Methode, um den Expressionsgrad unterschiedlicher Gene zu quantifizieren. Durch die Zugabe von CyberGreen, eines fluoreszierenden Stoffes, der an doppelsträngige DNS bindet, kann anhand der Fluoreszenz die Menge des PCR Produkts gemessen werden. Der Anstieg der Fluoreszenz ist dabei der Menge direkt proportional.

b) Methode

Die cDNA Proben wurden auf 1:10 mit H₂O_{dd} verdünnt und jeweils 5 µl in Duplikaten auf TaqMan 96-Loch-Platten pipettiert. In jedes well wurden 10 µl TaqMan Mastermix dazu pipettiert. Als Negativ-Kontrolle oder no-template-control enthalten 2 wells pro Primerpaar pro Platte stets statt cDNA nur H₂O_{dd}.

Die TaqMan Platten wurden kurz zentrifugiert, damit sich die cDNA mit dem Mastermix mischt und die geringen Volumina auf den Boden der Löcher der

PCR-Platte gelangen und anschließend mit einer durchsichtigen Kunststoffolie versiegelt und mit dem ABI PRISM[®] 7700 SDS von Perkin Elmer analysiert.

Die Parameter für die PCR wurden auf 2 min bei 50°C (Initiierung), 10 min bei 95°C (zur Aktivierung der TaqPolymerase) und dann 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 15 s und annealing/extension bei 60°C für 1 min festgelegt.

2.2.2.5. **Auswertung der TaqMan-PCR**

Die Fluoreszenzwerte werden bei jedem Zyklus aufgezeichnet und repräsentieren die Menge des amplifizierten Produkts. Als Vergleichswerte für weitere Berechnungen dienen die Ct-Werte (threshold cycle), relative Werte, die für die Zyklus-Anzahl bei Erreichen einer bestimmten Schwelle stehen. Je mehr DNA-Material in der Probe zu Beginn vorhanden ist, desto weniger Zyklen werden gebraucht, desto kleiner ist folglich der Ct-Wert. Für die 3 verwendeten Primerpärchen wurde jeweils immer der gleiche Schwellenwert (threshold) und die gleiche Grundlinie bestimmt. Es wird also nicht die insgesamt produzierte DNA-Menge nach 40 Zyklen gemessen, sondern diejenige, die zuerst mit der Stärke ihres Fluoreszenz-signals über dem Schwellenwert liegt. Vorteil hiervon ist, dass dadurch die Möglichkeit besteht, die einzelnen Proben in der exponentiellen Phase der DNA-Amplifikation miteinander zu vergleichen, und somit nicht die einzelnen Reaktionsteilnehmer die limitierenden Faktoren darstellen.

Zum Vergleich der verschiedenen Proben wurde die Deltadelta-Ct Methode angewandt, eine sehr effiziente Methode zur relativen Quantifizierung. Zunächst wurde aus den beiden Ct-Werten bei der festgelegten threshold der Duplikate der Mittelwert errechnet und von diesem Mittelwert der Ct-Mittelwert der gleichen Probe beim 18S house-keeping-gene subtrahiert (ΔCT).

Dann wurde jeder ΔCt -Wert mit einem beliebigen Kontroll- ΔCt -Wert, dem sogenannten Kalibrator, verglichen. Der Kalibrator war in diesem Fall ein ΔCt -

Wert einer kein-Antigen-Probe eines Patienten, der zirka dem Durchschnitt der kein-Antigen-Proben aller Patienten und Kontrollprobanden entsprach.

Nach folgender Formel wurden dann die relativen Werte berechnet, mit denen die statistischen Vergleiche durchgeführt wurden.

$$2^{-(\Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kalibrator}})} = \text{Endwert}$$

Eine Verdopplung dieses Wertes bedeutet eine Verdopplung der gemessenen mRNA-Transkripte.

2.2.3. Durchflußzytometrie (FACS)

2.2.3.1. Zellkultur für FACS

Die aus 2.2.1. gewonnenen PBMC wurden auf eine Konzentration von 2.5 Mio Zellen / ml mit CM verdünnt und jeweils 1 ml dieser Zelllösung auf 24-well-Platten pipettiert. Diese Zellen wurden mit 200 µl verschiedener Antigene in einer Endkonzentration von 10µg/ml, jeweils in Duplikaten, für die Zellkultur inkubiert.

Für den FACS Ansatz wurden die Antigene MOG 91-108, MOG 141-156, MOG 1-125, MOG 1-218, Influenza A, MBP 83-99, PHA und eine Mediumkontrolle (=kein-Antigen Kontrolle) verwendet.

2.2.3.2. Durchführung der FACS-Analyse

a) Prinzip

Mit der FACS-Analyse (FACS = fluorescence activated cell sorting) lassen sich Zellen anhand ihrer Oberflächenproteine durch monoklonale, an einen Fluoreszenzfarbstoff gebundene Antikörper klassifizieren.

Die Zellen in der Zellsuspension werden aus den Probenröhrchen gesaugt und in hoher Geschwindigkeit durch eine Stahlkapillare geführt. Mit der Trägerflüssigkeit FACSFlow™ wird ein laminarer Hüllstrom erzeugt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen so stark beschleunigt, dass sie einzeln hintereinander aufgereiht den Analysepunkt erreichen (hydrodynamische Fokussierung). Am Analysepunkt werden die Zellen von einem Argonionenlaserstrahl der Wellenlänge 488 nm erfasst und über die Lichtstreuung können mit fünf Photodetektoren Größe, Granularität und 3 verschiedene Fluoreszenzen gemessen werden.

Das in die Vorwärtsrichtung gestreute Licht bezeichnet man als forward light scatter (FSC). Dieser Parameter ist in erster Linie ein Maß für die Größe der Zellen. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hängt hauptsächlich von der intrazellulären Granularität ab und wird als sideward scatter (SSC) bezeichnet. Man kann aus diesen beiden Messungen auf die Identität und Vitalität einzelner Zellpopulationen schließen.

Zum anderen werden die fluoreszierenden Farbstoffe, meistens FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) und PE (Phycoerythin), durch den Lichtstrahl angeregt und emittieren kurzwelligere Lichtspektren, die von anderen Detektoren gemessen werden. Die Stärke der Lichtemission der Fluoreszenzfarbstoffe ist proportional zu der Zahl der auf der Zelloberfläche gebundenen markierten Antikörper und somit auch der Anzahl der zu messenden Oberflächenmoleküle.

Da die fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper nicht nur an spezifische Epitope auf der Zelloberfläche binden, sondern auch zu einem geringen Teil an unspezifischen Bindungsstellen, kann dies zu Messfehlern führen. Daher wird in

jedem Versuch der Anteil dieser unspezifischen Bindungen mit Hilfe der Isotypkontrollen ermittelt. Dafür wird eine Mischung aus unspezifischen isotypgleichen IgG Antikörpern verwendet, die auch mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff(en) wie die spezifischen Antikörper markiert sind. Das Programm des Durchflußzytometers wird in seiner Fluoreszenzverstärkung dann so eingestellt, dass die unspezifischen Bindungen nicht als fluoreszenzpositiv erscheinen. Die Schwelle wird dabei für alle Fluoreszenzen auf 10^1 justiert.

Die Analyse der Zellen wurde mit einem Zytometer der Firma Beckton Dickinson, Immunocytometry Systems und der CellQuest® -Software durchgeführt.

b) Methode

Nach 48 h im Inkubator wurden die Zelllösungen aus der Platte mit einer Pipette herausgelöst und jeder Antigenansatz jeweils in einem 15 ml-Schraubdeckelröhrchen pipettiert und bei 1.000 U/min (400 g) für 10 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde abpipettiert und bei -20°C für eventuelle weitere Experimente eingefroren. Die sedimentierten Zellen wurden in je 500 μl FACS Puffer resuspendiert, so dass auf die Ausgangskonzentration bezogen in 100 μl eine Million Zellen gelöst waren. Dann wurden von jedem Ansatz der in FACS Puffer gelösten Zellen jeweils für CXCR3, CXCR4 und die Isotypen Kontrolle 90 μl auf eine 96-Loch-Platte pipettiert und anschließend in jedes well 10 μl Blockier-Medium mit einer Mehrkanalpipette dazu pipettiert und im Kühlschrank bei 8°C für 10 min inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die PE markierten Antikörper gegen CXCR3 (IgG1), CXCR4 (IgG2a) und die Isotypen-Antikörper (IgG1 + IgG2a) dazugegeben. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit bei 4°C im Kühlschrank wurden die Zellen in zwei Zentrifugationsritten bei 1.000 U/min (400 g) für 10 min mit zuerst 100 μl FACS Puffer und im zweiten Schritt 200 μl FACS Puffer gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden wiederum in 400 μl FACS Puffer resuspendiert und in 1 ml Rundbodenröhrchen zur FACS Messung überführt.

Die Proben in den FACS-Röhrchen wurden auf Eis gekühlt und vor der Messung im FACS-Gerät mit einem Mikroschüttler gemischt und dann der Messung zugeführt.

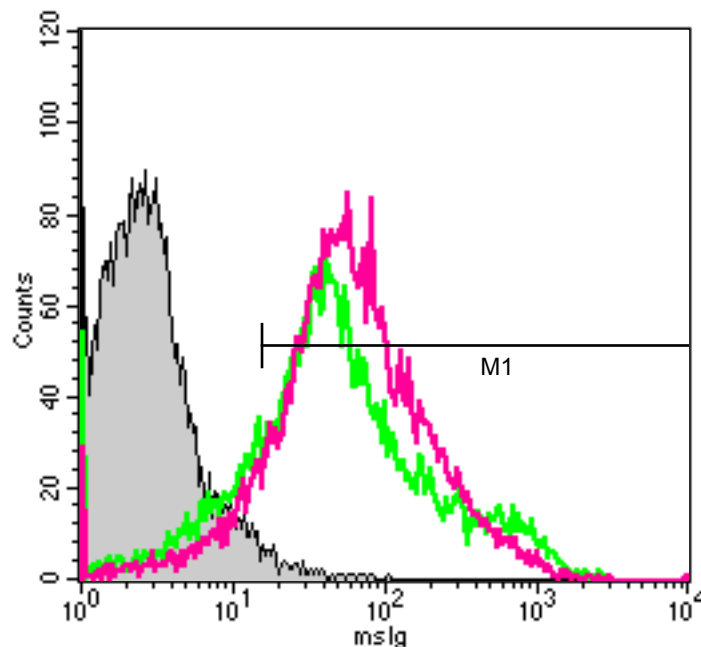
2.2.3.3. **Auswertung der FACS-Analyse**

Die CellQuest[®] -Software ermöglicht die graphische Darstellung der gemessenen Werte. Die FSC- und SSC- Lichtintensität wurde in einem Diagramm gegeneinander dargestellt, die FSC-Intensitäten auf der Abszisse, die SSC-Intensitäten auf der Ordinate. Hier zeigten sich jeweils zwei hinsichtlich Größe und Granularität deutlich abgrenzbare, zusammenhängende und homogene Zellwolken, die den Monozyten/Makrophagen einerseits und den Lymphozyten andererseits entsprachen, wie man anhand Doppelfärbungen mit CD4 oder CD14 beweisen konnte. Die Lymphozytenwolke wurde für die Analyse stets durch ein Fenster (= Gate) markiert. Somit kamen nur die in diesem Fenster enthaltenen Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensitäten zur Darstellung. Gezählt und gemessen wurde bei jeder Einzelprobe solange bis im Fenster 20.000 Zellen registriert waren, was die Vergleichbarkeit der ermittelten spezifischen Fluoreszenz mit der jeweiligen, zugehörigen Negativkontrolle ermöglichte.

In den Versuchen wurde nur ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, nämlich PE, der an die Antikörper gegen CXCR3 und CXCR4 und die Isotypen-Kontroll-Antikörper gekoppelt war. Die PE-Intensitäten der in dem Fenster enthaltenen Zellen wurden deswegen in der Einparameterdarstellung, dem Histogramm, dargestellt, das auf seiner Abszisse die Fluoreszenzen in logarithmischen Klassen des Messbereichs und auf seiner Ordinate die Anzahl der Ereignisse je Klasse angibt.

Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurden jeweils 3 Intensitätsverteilungen zusammen in einem Histogramm dargestellt (siehe Abbildung):

1. der Zellen der Isotypenkontrolle des Medium-Kontroll-Ansatzes (in der Abbildung die grau ausgefüllte Kurve ganz links)
2. der Zellen des Medium-Kontroll-Ansatzes, die spezifisch mit Antikörpern gegen CXCR3 oder CXCR4 markiert waren (in der Abbildung die hellgraue Kurve) und
3. jeweils der Zellen der verschiedenen Antigen-Ansätze, die spezifisch mit Antikörpern gegen CXCR 3 oder CXCR4 markiert waren (in der Abbildung die dunklere Kurve).



2.2.4. Statistische Datenauswertung

Aus den Werten der einzelnen Patienten und Kontrollen wurde für jedes Antigen jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die statistische Signifikanz dieser Mittelwerte wurde durch Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Bonferroni post hoc-Test unter Verwendung der Software SPSS[®] ermittelt. Bei der Interpretation der ermittelten p-Werte wurde die Signifikanzschwelle bei $P = 0,05$ gesetzt, so dass ein signifikanter Unterschied bei $P < 0,05$ angenommen wurde.

3. ERGEBNISSE

3.1. CXCR3

3.1.1. CXCR3-Induktion nach Stimulation mit MOG-Antigenen (TaqMan-PCR)

Es wurden PBMC von MS-Patienten und Kontrollpersonen mit verschiedenen Antigenen in einer Zellkultur stimuliert. Anschließend wurde die CXCR3-Induktion anhand der mRNA-Transkripte mit der TaqMan-PCR Methode gemessen.

Die Ergebnisse der Stimulation mit MOG-Peptiden stand bei den Untersuchungen im Vordergrund. Außerdem wurde zum Vergleich zwischen der Potenz von MOG und MBP mit dem immundominanten MBP-Peptid (83-99) stimuliert. Influenza A-Peptid diente als Kontroll-Peptid, das nicht MS-assoziiert ist, und somit bei Patienten- und Kontrollgruppenzellen die gleichen Reaktionen hervorrufen sollte. Als Positivkontrolle wurde das Mitogen PHA verwendet.

Als Negativkontrolle dienten die 'kein Antigen'-Proben bzw. 'Medium'-Proben, die ohne Antigen, aber unter denselben Kulturbedingungen wie die restlichen Proben inkubierten.

Verglichen wurden die Induktionen zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe bei den einzelnen Antigenen. Darüber hinaus die Unterschiede zwischen Patienten mit schubförmigem Krankheitsverlauf und Patienten mit chronisch-progredientem Verlauf. Außerdem wurden die Induktionswerte der verschiedenen Antigene untereinander verglichen.

Die Patientengruppe umfasste 20 Testpersonen, davon 13 mit einem schubförmigen Verlauf und 6 mit chronisch-progredientem Verlauf, die Kontrollgruppe umfasste 13 Personen (bei einem Patient war der Krankheitsverlauf unbekannt).

Außerdem wurden PBMC von Patienten und Kontrollen direkt nach der Isolierung, also ohne vorherige Zellkultur, untersucht, um die Basalinduktion von CXCR3 zu bestimmen und diese zwischen den Gruppen zu vergleichen. Diese 'ohne Inkubation'-Proben bzw. 'native PBMC'-Proben waren formell eine weitere Negativkontrolle.

Für die Diagramme wurden jeweils die Mittelwerte aus den CT-Werten für jedes Antigen bei den einzelnen Gruppen gebildet.

Die Expressionswerte für CXCR3 und CXCR4 der einzelnen Patienten und Kontrollpersonen bei den unterschiedlichen Antigenen sind in den Tabellen im Anhang wiedergegeben.

Ergebnisse:

Die basale CXCR3-Induktion der nativen PBMC, d. h. ohne Zellkultur, war bei Patienten und Kontrollen gleich niedrig. Auch zwischen schubförmigen Patienten und chronisch-progredienten Patienten gab es keinen signifikanten Unterschied.

Interessanterweise waren die Werte der 'Medium'-Negativkontrolle ('kein Antigen'-Proben) deutlich höher als die der nativen PBMC, was darauf hindeutet, dass die Zellkultur alleine, auch ohne Antigenstimulation, zu einer erhöhten Induktion von CXCR3 bei den PBMC führt. Für die Vergleiche mit den Antigenen wurde aus diesem Grund als Negativkontrolle nur die 'Medium'-Negativkontrolle verwendet.

Es gab zwischen Patienten und Kontrollen bei keinem Antigen signifikante Unterschiede der CT-Mittelwerte. Die Werte sind sogar fast identisch (siehe Abbildungen 1a und 1b; Tabellen 1a und 1b). Der Unterschied zwischen den beiden Diagrammen ist, dass bei Abbildung 1b ein Quotient aus den Mittelwerten der einzelnen Peptide und dem Mittelwert der Negativkontrolle ('Medium'-Proben) gebildet wurde. Dadurch sind die Werte weniger anfällig für Ausreißer und die Standardabweichung verringert sich. Allerdings hatte diese Variante keine Auswirkung auf die Ergebnisse bei diesem Vergleich.

Auch zwischen Patienten mit schubförmigem Verlauf und Patienten mit chronisch-progredientem Verlauf gab es keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 2; Tabelle 2). Für dieses Diagramm wurden wieder die Mittelwerte bei den einzelnen Antigenen durch die Negativkontrolle geteilt und graphisch dargestellt. Das war hier erforderlich, da die Gruppen ziemlich klein waren und es sonst leicht zu Verfälschungen gekommen wäre.

Unter den Antigenen gab es deutliche Unterschiede (Abbildungen 1a und 1b), wobei die Unterschiede bei Patienten und Kontrollen gleichermaßen zu sehen sind.

Die kürzeren MOG-Peptide (MOG 91-108, MOG 93-108, MOG 141-156, MOG 146-154) zeigten eine nur gering erhöhte Induktion von CXCR3 gegenüber der Negativkontrolle.

MBP 83-99 wies bei der Kontrollgruppe fast die gleichen Werte wie die kürzeren MOG-Peptide auf; bei der Patientengruppe einen leicht niedrigeren Wert. Der Unterschied war aber nicht signifikant.

MOG 1-125 zeigte eine höhere Induktion von CXCR3 nach Inkubation gegenüber den kürzeren MOG-Peptiden und MBP 83-99. Die Kontroll-Gruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle und zu den anderen Antigenen. Bei der Patientengruppe war die Induktion gegenüber MBP 83-99 signifikant erhöht ($P < 0,05$) und fast signifikant gegenüber der Negativkontrolle ($P = 0,123$) und MOG 93-108 ($P = 0,101$).

MOG 1-218 erreichte noch höhere Werte als MOG 1-125. Dennoch waren bei der Kontrollgruppe die Werte nicht signifikant höher. Bei der Patientengruppe dagegen war die Induktion durch MOG 1-218 gegenüber der Negativkontrolle und allen anderen Antigenen bis auf MOG 1-125 und PHA signifikant erhöht ($P < 0,05$).

Die CT-Werte der Positivkontrolle PHA waren gegenüber allen anderen Werten signifikant erhöht ($P = 0,00$), bis auf MOG 1-218 (bei Kontrollen: $P = 0,013$ signifikant, bei Patienten: $P = 0,131$ fast signifikant).

Zusammengefaßt waren die Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf untereinander sehr gering. Das gilt sowohl für native PBMC als auch für PBMC nach Zellkultur.

Die großen MOG-Peptide, das extrazelluläre MOG 1-125 und das gesamte MOG 1-218, zeigten eine deutliche Induktion von CXCR3. Die übrigen Antigene konnten keine deutlich erkennbare Induktion erzeugen.

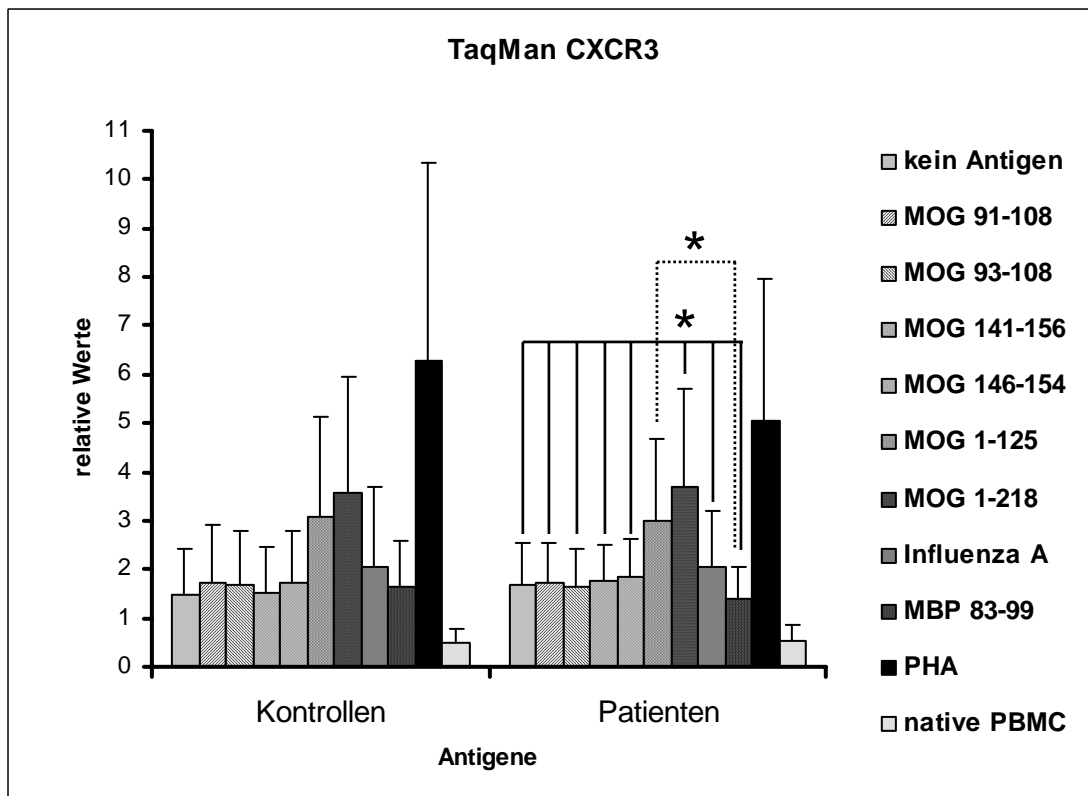


Abb. 1a. CXCR3 – Induktion nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen

Gezeigt sind die Mittelwerte der $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ –Werte, d. h. der relativen Werte der einzelnen Patienten und Kontrollpersonen für die einzelnen Antigene, einschließlich der Standardabweichungen. Das Kontrollenkollektiv umfasste 13 Personen, das Patientenkollektiv 20 Personen. Dargestellt sind die Ergebnisse nach Stimulation mit MOG 91-108, MOG 93-108, MOG 141-156, MOG 146-154, MOG 1-125, MOG 1-218, Influenza A-Peptid, MBP 83-99, PHA und die Negativkontrollen.

Es ist zu erkennen, dass die Antigene MOG 1-125 und MOG 1-218 zu einer gesteigerten Induktion von CXCR3 führten. Die übrigen Antigene zeigten gegenüber der 'kein Antigen'-Kontrolle keine deutlich erhöhte Induktion.

Die Werte sind bei den Patienten und den Kontrollen sowohl bei nativen PBMC als auch nach Stimulation mit Antigenen gleich.

(* = signifikanter Unterschied, $P < 0,05$)

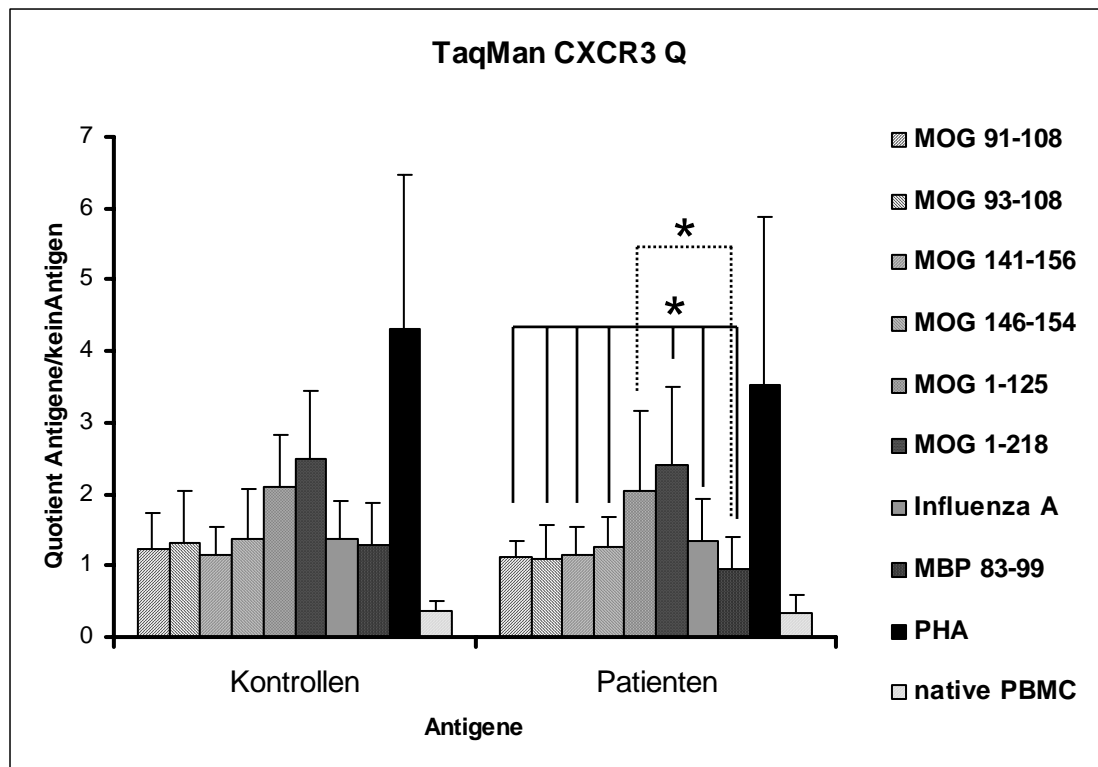


Abb. 1b. *CXCR3 – Induktion nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen*

Gezeigt ist eine abgewandelte Form der Abbildung 1a. Die Mittelwerte der relativen Werte der einzelnen Patienten und Kontrollpersonen für die einzelnen Antigene wurden durch die Mittelwerte der relativen Werte der Medium-Kontrollen ('kein Antigen') jeweils der Patienten- oder Kontrollgruppe geteilt, außerdem sind die Standardabweichungen dargestellt. Der Vorteil davon liegt darin, dass die Standardabweichungen kleiner werden und Ausreißer nicht so sehr ins Gewicht fallen.

Das Kontrollenkollektiv umfasste 13 Personen, das Patientenkollektiv 20 Personen. Dargestellt sind die Ergebnisse nach Stimulation mit MOG 91-108, MOG 93-108, MOG 141-156, MOG 146-154, MOG 1-125, MOG 1-218, Influenza A-Peptid, MBP 83-99, PHA und die Werte der nativen PBMC in Relation zur Medium-Kontrolle.

Es ist zu erkennen, dass die Antigene MOG 1-125 und MOG 1-218 zu einer gesteigerten Induktion von CXCR3 führten. Die übrigen Antigene zeigten gegenüber der Medium-Kontrolle keine deutlich erhöhte Induktion.

(* = signifikanter Unterschied, $P < 0,05$)

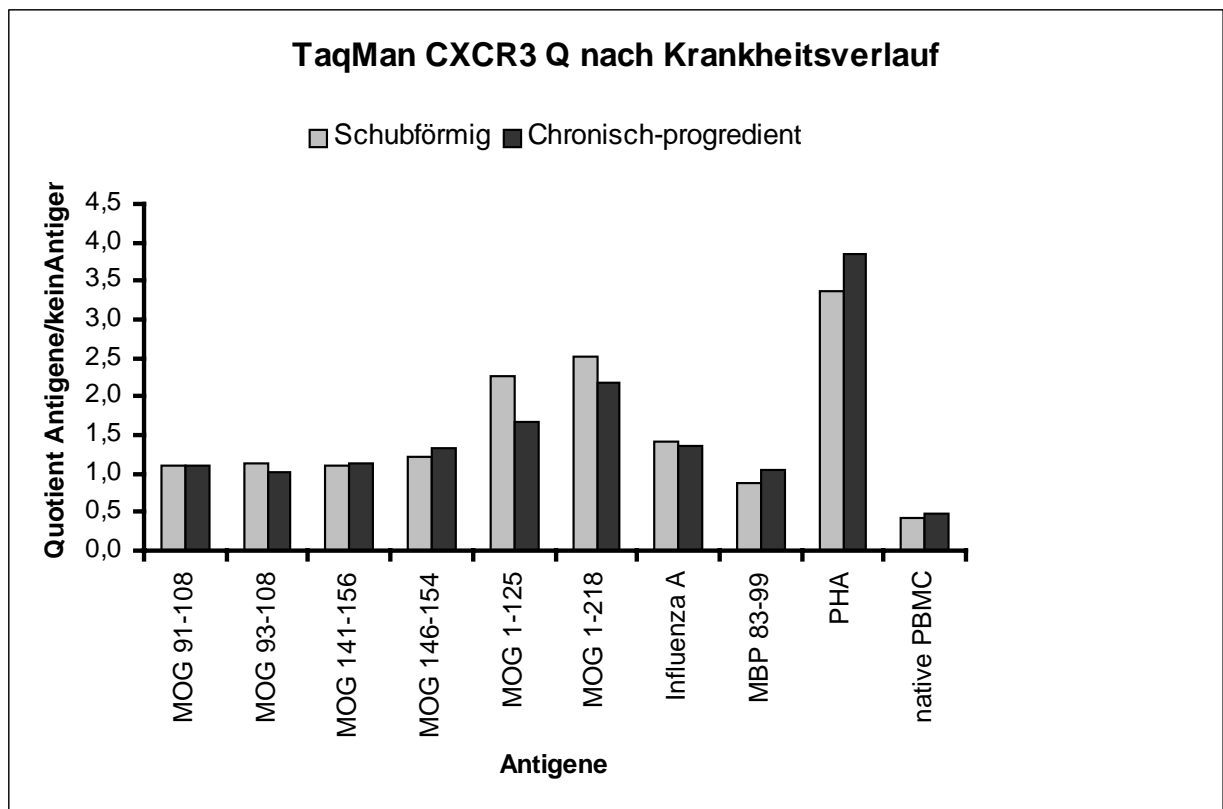


Abb. 2. CXCR3 – Induktion nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen

Gezeigt ist der Vergleich zwischen den Patienten mit schubförmigem Verlauf und den Patienten mit chronisch-progredientem Krankheitsverlauf innerhalb der Patientengruppe aus den beiden vorherigen Diagrammen. Wie in Abbildung 1b wurde ein Quotient gebildet aus den Mittelwerten der relativen Werte der unterschiedlichen Antigene und den Mittelwerten der relativen Werte der Medium-Kontrollen.

Das Kollektiv der schubförmigen Patienten umfasste 13 Patienten, das der chronisch-progredienten Patienten 6 Patienten.

Dargestellt sind wieder die Ergebnisse nach Stimulation mit MOG 91-108, MOG 93-108, MOG 141-156, MOG 146-154, MOG 1-125, MOG 1-218, Influenza A-Peptid, MBP 83-99, PHA und die der nativen PBMC.

Es sind keine deutlichen Unterschiede bei der CXCR3-Induktion zwischen den beiden Krankheitsverläufen zu erkennen.

3.1.2. CXCR3-Expression nach Stimulation mit MOG-Antigenen (FACS)

Nach der Messung der CXCR3-Induktion durch MOG und andere Antigene mit Hilfe der TaqMan-PCR wurde anschließend die CXCR3-Expression auf Lymphozyten im Durchflußzytometer (FACS) bestimmt, um zu sehen, ob auch wirklich die Rezeptoren gebildet und exprimiert werden, und um die Ergebnisse der TaqMan-PCR Experimente zu bestätigen oder zu ergänzen.

Es wurden wiederum PBMC von MS-Patienten und Kontrollpersonen mit verschiedenen Antigenen in einer Zellkultur stimuliert. Anschließend wurden die PBMC mit Antikörpern gegen CXCR3 markiert und die Zahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit der FACS-Methode gemessen. Im FSC/SSC-Dotplot-Diagramm wurde die Lymphozyten-Population eingegrenzt (Gate) und nur die Fluoreszenz dieser Zellgruppe gemessen. Dass es sich bei den untersuchten Zellwolken tatsächlich um Lymphozyten handelte, wurde mit Kontroll-Doppelfärbungen gegen CD4 bzw. CD14 bestätigt.

Als Antigene wurden MOG 91-108, MOG 141-146, MOG 1-125 und MOG 1-218 verwendet. Darüber hinaus, wie schon bei den TaqMan-PCR Untersuchungen, MBP 83-99, Influenza A-Peptid und PHA als Positivkontrolle. Eine Probe war wieder die 'kein-Antigen'-Negativkontrolle bzw. 'Medium'-Kontrolle.

In den FACS-Histogrammen wurden für jeden Antigen-Ansatz drei Intensitätsverteilungen übereinander dargestellt: Die Intensitätsverteilung der (1) Zellen der Isotypen-Kontrolle des Medium-Kontroll-Ansatzes, der (2) Zellen des Medium-Kontroll-Ansatzes, die spezifisch mit Antikörpern gegen CXCR3 markiert waren und jeweils der (3) Zellen der verschiedenen Antigen-Ansätze, die spezifisch mit Antikörpern gegen CXCR 3 markiert waren (siehe auch 'Material und Methoden').

Für die statistische Auswertung wurde in jedes Histogramm ein Marker eingebaut, der 99% der gemessenen Intensität der unspezifischen Isotypen-Kontrolle des Medium-Kontroll-Ansatzes ausblendet, so dass für die Messung der spezifischen Ansätze nur die Ereignisse berücksichtigt wurden, die über der Intensität der Isotypen-Kontrolle lagen und somit spezifisch für CXCR3 waren. Bestimmt wurden die geometrischen Mittelwerte der Intensitäten der Ereignisse. Wiederum wurden die gemessenen geometrischen Mittelwerte der einzelnen Proben für die verschiedenen Antigene als Quotient in Relation zur jeweiligen Negativkontrolle gesetzt. Aus diesen Quotienten der geometrischen Mittelwerte wurde ein Mittelwert aus den Ergebnissen des Patienten- bzw. Kontrollgruppenkollektivs für jedes Antigen gebildet und in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 3). Die absoluten Werte der Negativkontrollen waren bei Patienten und Kontrollen gleich groß (nicht dargestellt).

Die Patientengruppe und die Kontrollgruppe umfassten jeweils 6 Personen. Aufgrund des relativ kleinen Kollektivs konnte die Patientengruppe nicht mehr weiter nach dem Krankheitsverlauf geteilt und getrennt untersucht werden. Trotz des verhältnismäßig kleinen Kollektivs sind die Ergebnisse aussagekräftig, da die Werte sehr homogen waren und es keine großen Abweichungen gab.

Verglichen wurden wieder Unterschiede bei den einzelnen Antigenen zwischen Patienten und Kontrollpersonen und Unterschiede zwischen den einzelnen Antigenen untereinander.

Ergebnisse:

Zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe gibt es einen auffälligen und signifikanten ($P < 0,05$) Unterschied (Abbildung 3). Die Expression von CXCR3 nach Stimulation mit dem extrazellulären MOG 1-125 ist bei den Patienten deutlich höher als bei den Kontrollpersonen.

Zwar sind auch die Expressionen nach Stimulation mit MOG 1-218, Influenza A und PHA etwas höher bei den Patienten, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Innerhalb der beiden Gruppen konnten Unterschiede in der CXCR3-Expression bei den verschiedenen Antigenen festgestellt werden.

Wie schon bei den TaqMan-PCR Ergebnissen waren die Expressionen bei den kürzeren MOG-Peptiden MOG 91-108 und MOG 141-156 sowie bei MBP 83-99 nur gering gegenüber der Negativkontrolle erhöht und auch untereinander nicht signifikant unterschiedlich.

Das extrazelluläre MOG (MOG 1-125) induzierte bei den Patienten und bei den Kontrollen die höchste CXCR3-Expression nach PHA, wobei die Expression bei den Patienten deutlich höher war und nur bei den Patienten der Unterschied gegenüber der Negativkontrolle signifikant war ($P < 0,05$). Die Unterschiede zu den anderen Antigenen sind aber weder bei den Patienten noch bei den Kontrollen signifikant.

Die Expression nach Stimulation mit MOG 1-218 war zwar höher als bei den kürzeren MOG-Peptiden und MBP, die Unterschiede waren aber nicht signifikant, weder bei den Patienten noch bei den Kontrollen.

Die Expression nach Stimulation mit dem Mitogen PHA war sowohl bei Patienten als auch bei den Kontrollen signifikant höher als bei allen Antigenen. Die einzige Ausnahme bildet MOG 1-125 bei den Patienten.

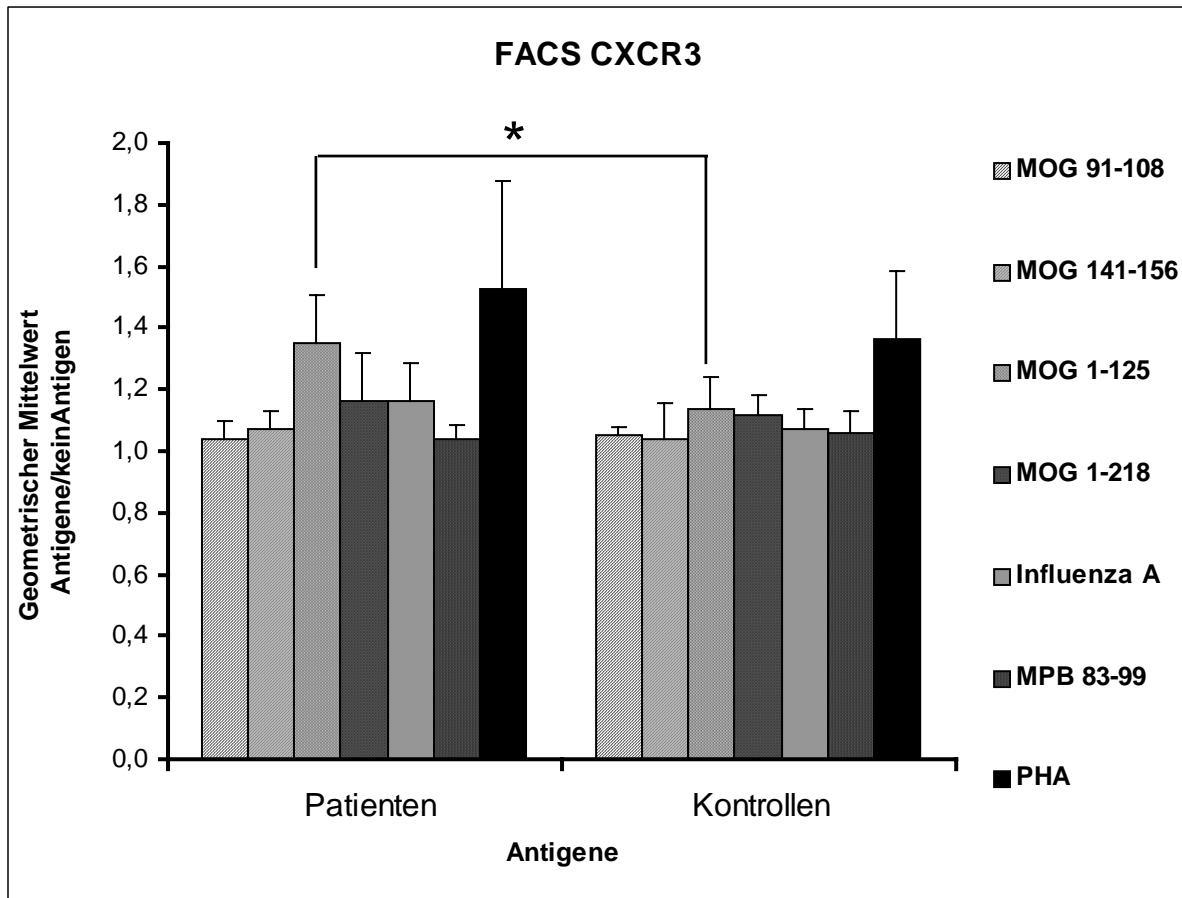


Abb. 3. CXCR3-Expression nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen

Gezeigt sind die Mittelwerte der CXCR3-Expression von 6 Patienten und 6 Kontrollen für jedes Antigen, gemessen durch FACS.

Stimuliert wurde mit MOG 91-108, MOG 141-156, MOG 1-125, MOG 1-218, Influenza A-Peptid, MBP 83-99 und PHA.

Es wurde ein Quotient aus den geometrischen Mittelwerten der einzelnen Antigene und der Negativkontrolle gebildet.

Beim Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen ist einzig die Expression von CXCR3 nach Stimulation mit MOG 1-125 signifikant erhöht ($P < 0,05$).

Zwischen den einzelnen Antigenen innerhalb der beiden Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen. (* = signifikanter Unterschied, $P < 0,05$)

Tabelle 3 (Anhang) zeigt alle geometrischen Mittelwerte, die in Abbildung 3 eingegangen sind. Daneben sind auch die Prozentwerte angegeben, die ausagen, wie viele Zellen von allen getageten Zellen innerhalb des Markers lagen.

3.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse für CXCR3

Sowohl bei den Untersuchungen mit der TaqMan-PCR als auch bei Untersuchungen mit FACS konnte gezeigt werden, dass die CXCR3-Rezeptoren in PBMC durch Stimulation mit Autoantigenen hochreguliert werden können.

Zwar war der induzierende Effekt bei den kürzeren MOG-Peptiden nicht groß oder signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle, aber er war dennoch zu erkennen.

Wesentlich größer aber war die Reaktion auf die größeren MOG-Polypeptide MOG 1-125 und MOG 1-218, die beide, zumindest bei den TaqMan-PCR Untersuchungen, eine deutliche Induktion von CXCR3 bewirkten, zum Teil mit signifikant erhöhten Werten, nicht nur gegenüber der Negativkontrolle, sondern auch gegenüber den anderen Antigenen. Im FACS waren die Werte für diese beiden Antigene auch höher als bei den anderen Antigenen, wenngleich nur die Werte nach Stimulation mit MOG 1-125 in der Patientengruppe deutlich erhöht waren.

Beim Vergleich zwischen den TaqMan-PCR Untersuchungen und den FACS Untersuchungen fällt auf, dass die Induktion auf mRNA-Ebene viel deutlicher zu erkennen ist als auf Rezeptorebene.

Zwischen dem Patientenkollektiv und dem Kontrollpersonenkollektiv waren die Unterschiede bei den einzelnen Antigenen nur gering und nicht signifikant. Die einzige Ausnahme war die CXCR3 Expression nach Stimulation mit MOG 1-125 im FACS. Allerdings waren bei den TaqMan-PCR Untersuchungen bei den Patienten die Induktionen von CXCR3 nach Stimulation mit MOG 1-125 und MOG 1-218 deutlicher gegenüber den anderen Antigenen als bei den Kontrollen, und nur bei der Patientengruppe gab es signifikante Unterschiede.

Die Untersuchung der CXCR3-Expression der nativen PBMC ergab keine erhöhte Expression bei den Patienten gegenüber den Kontrollpersonen.

Der unterschiedliche Krankheitsverlauf innerhalb des Patientenkollektivs hatte keine Auswirkung auf die CXCR3-Expression.

3.2. CXCR4

3.2.1. CXCR4-Induktion nach Stimulation mit MOG-Antigenen (TaqMan-PCR)

Es wurden PBMC von MS-Patienten und Kontrollpersonen mit verschiedenen Antigenen in einer Zellkultur stimuliert. Anschließend wurde die CXCR4-Induktion anhand der mRNA-Transkripte mit der TaqMan-PCR Methode gemessen.

Die Ergebnisse der Stimulation mit MOG-Peptiden stand bei den Untersuchungen von CXCR4, wie schon für CXCR3, auch wieder im Vordergrund. Zum Vergleich zwischen der Potenz von MOG und MBP wurde auch wieder mit dem immundominanten MBP-Peptid (83-99) stimuliert. Influenza A-Peptid diente als Kontroll-Peptid, das nicht MS-assoziiert ist, und somit bei Patienten- und Kontrollgruppenzellen die gleichen Reaktionen hervorrufen sollte. Als Positivkontrolle wurde das Mitogen PHA verwendet, genauso wie bei den Untersuchungen von CXCR3.

Als Negativkontrolle dienten die 'kein Antigen'-Proben bzw. 'Medium'-Proben, die ohne Antigen, aber unter denselben Kulturbedingungen wie die restlichen Proben inkubierten.

Verglichen wurden die Induktionen zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe bei den einzelnen Antigenen. Darüber hinaus die Unterschiede zwischen Patienten mit schubförmigem Krankheitsverlauf und Patienten mit chronisch-progredientem Verlauf. Außerdem wurden die Induktionswerte der verschiedenen Antigene untereinander verglichen.

Die Proben für die TaqMan-PCR stammen von denselben Personen wie schon für CXCR3.

Die Patientengruppe umfasste 20 Testpersonen, davon 13 mit einem schubförmigen Verlauf und 6 mit chronisch-progredientem Verlauf, die Kontrollgruppe umfasste 13 Personen (bei einem Patient war der Krankheitsverlauf unbekannt).

Außerdem wurden PBMC von Patienten und Kontrollen direkt nach der Isolierung, also ohne vorherige Zellkultur, untersucht, um die Basalinduktion von CXCR3 zu bestimmen und diese zwischen den Gruppen zu vergleichen. Diese 'ohne Inkubation'-Proben bzw. 'native PBMC'-Proben waren formell eine weitere Negativkontrolle.

Für die Diagramme wurden jeweils die Mittelwerte aus den CT-Werten für jedes Antigen bei den einzelnen Gruppen gebildet.

Ergebnisse:

Die basale CXCR4-Induktion der nativen PBMC, d. h. ohne Zellkultur, war bei Patienten und Kontrollen fast gleich. Auch zwischen schubförmigen Patienten und chronisch-progredienten Patienten gab es keinen signifikanten Unterschied.

Die Werte der nativen PBMC waren nur leicht niedriger als die Werte der Medium-Kontrollen; es konnte hier also im Gegensatz zu CXCR3 keine durch die Zellkultur bedingte Induktion festgestellt werden. Für die Vergleiche mit den Antigenen wurde aber, genauso wie bei CXCR3, als Negativkontrolle die 'Medium'-Negativkontrolle verwendet.

Es gab zwischen Patienten und Kontrollen bei keinem Antigen signifikante Unterschiede der CT-Mittelwerte. Die Werte sind sogar nahezu identisch (siehe Abbildungen 4a und 4b). Der Unterschied zwischen den beiden Diagrammen ist wieder, dass bei Abbildung 4b ein Quotient aus den Mittelwerten der einzelnen

Peptide und dem Mittelwert der Negativkontrolle gebildet wurde. Dadurch sind die Werte weniger anfällig für Ausreißer und die Standardabweichung verringert sich. Durch diese Darstellung sind auch einige Unterschiede zwischen den Antigenen signifikant geworden, v. a. bei der Kontrollgruppe (siehe Abbildungen 4a und 4b).

Auch zwischen Patienten mit schubförmigem Verlauf und Patienten mit chronisch-progredientem Verlauf gab es keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 5). Für dieses Diagramm wurden wieder die Mittelwerte bei den einzelnen Antigenen durch die Negativkontrolle geteilt und graphisch dargestellt.

Zwischen den einzelnen Antigenen innerhalb der Gruppen gab es einige bemerkenswerte Unterschiede. Diese Unterschiede sind in beiden Gruppen gleichermaßen zu sehen (siehe Abbildungen 4a und 4b).

Das Auffälligste an den Diagrammen ist, dass die MOG-Peptide zu einer Induktion von CXCR4 führen – die kürzeren Peptide weniger und die vermeintlich potenteren größeren Peptide mehr – während das Mitogen PHA zu einer Induktionshemmung führt.

Die 3 kürzeren MOG-Peptide MOG 91-108, MOG 93-108 und MOG 141-156 zeigten eine nur geringfügig erhöhte Induktion von CXCR4, genauso wie MBP 83-99 und Influenza A-Peptid.

Das MOG-Peptid MOG 146-154 zeigte eine erkennbar höhere Induktion als die anderen kürzeren MOG-Peptide, aber auch bei MOG 146-154 waren die Unterschiede gegenüber der Negativkontrolle nicht signifikant. Allerdings war der Unterschied zwischen MOG 146-154 und PHA in der relativen Darstellung, das heißt bei der Darstellung des Quotienten aus den $2^{-\Delta\Delta Ct}$ –Werten der jeweiligen Antigene durch den der Negativkontrolle, bei Patienten und Kontrollen signifikant ($P < 0,05$), nicht jedoch in der Darstellung der absoluten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ –Werte.

Das extrazelluläre MOG-Peptid (MOG 1-125) bewirkte eine noch höhere Induktion von CXCR4 als MOG 146-154. Die Werte nach einer Stimulation mit MOG 1-125 waren signifikant höher als die Werte nach Stimulation mit PHA ($P < 0,05$), sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen. Allerdings ist dieser Unterschied bei den Kontrollen wiederum nur in der relativen Darstellung signifikant.

Das gesamte MOG (MOG 1-218) erzielte die höchsten Induktionswerte von CXCR4. Die Werte waren in der relativen Darstellung sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen signifikant höher als bei fast allen übrigen Antigenen, ausgenommen MOG 146-154 und MOG 1-125 ($P < 0,05$). In der absoluten Darstellung ist bei den Kontrollen die Induktion von MOG 1-218 nur im Vergleich zu PHA signifikant erhöht.

Zusammengefaßt waren die Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten und Patienten mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf untereinander sehr gering. Das gilt sowohl für native PBMC als auch für PBMC nach Zellkultur.

Die großen MOG-Peptide, das extrazelluläre MOG 1-125 und das gesamte MOG 1-218, und zu einem geringen Maße auch MOG 146-154, zeigten eine deutliche Induktion von CXCR4. PHA dagegen bewirkte eine deutliche Induktionshemmung: Die Werte lagen deutlich unter der Negativkontrolle. Die übrigen Antigene konnten nur eine leichte Induktion erzeugen.

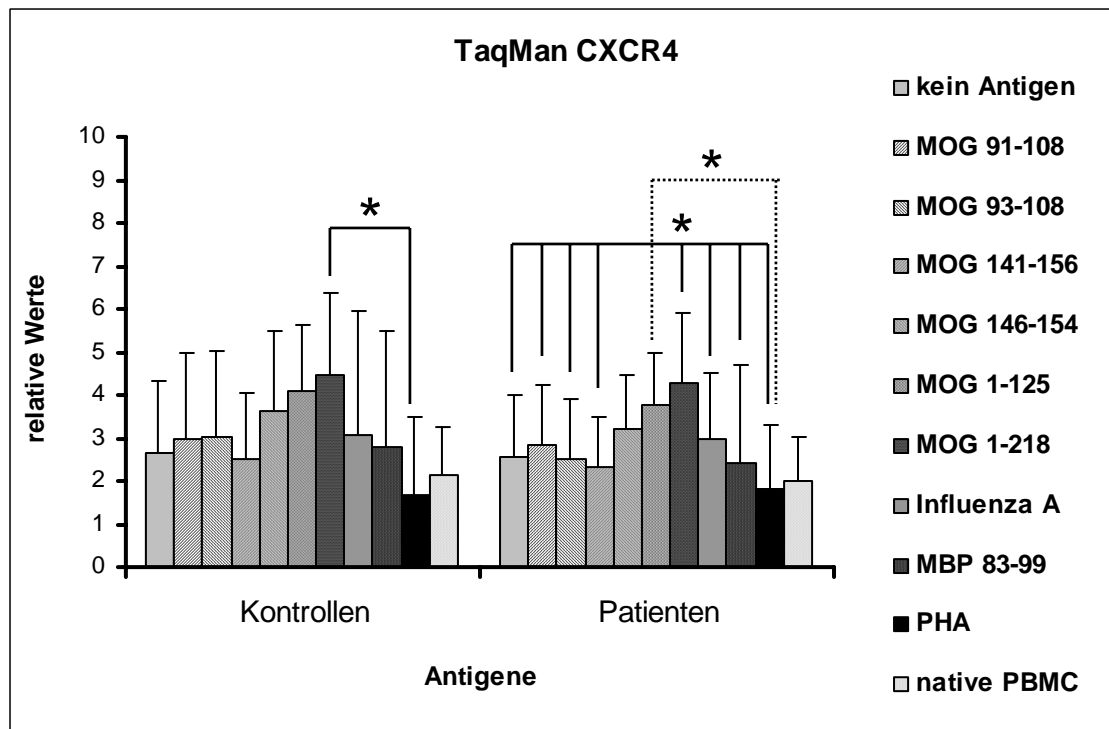


Abb. 4a. CXCR4 – Induktion nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen

Gezeigt sind die Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ –Werte der einzelnen Patienten und Kontrollpersonen für die einzelnen Antigene, einschließlich der Standardabweichungen. Das Kontrollenkollektiv umfasste 13 Personen, das Patientenkollektiv 20 Personen.

Dargestellt sind die Ergebnisse nach Stimulation mit MOG 91-108, MOG 93-108, MOG 141-156, MOG 146-154, MOG 1-125, MOG 1-218, Influenza A-Peptid, MBP 83-99, PHA und die Negativkontrollen.

Es ist zu erkennen, dass die Antigene MOG 1-125 und MOG 1-218 zu einer gesteigerten Induktion von CXCR4 führten und zu einem geringeren Maß auch MOG 146-154, während PHA zu einer verminderten Induktion führte. Die übrigen Antigene zeigten gegenüber der 'kein Antigen'-Kontrolle keine deutlich erhöhte oder verminderte Induktion. (* = signifikanter Unterschied, $P < 0,05$)

Die Werte sind bei den Patienten und den Kontrollen sowohl bei nativen PBMC als auch nach Stimulation mit Antigenen gleich.

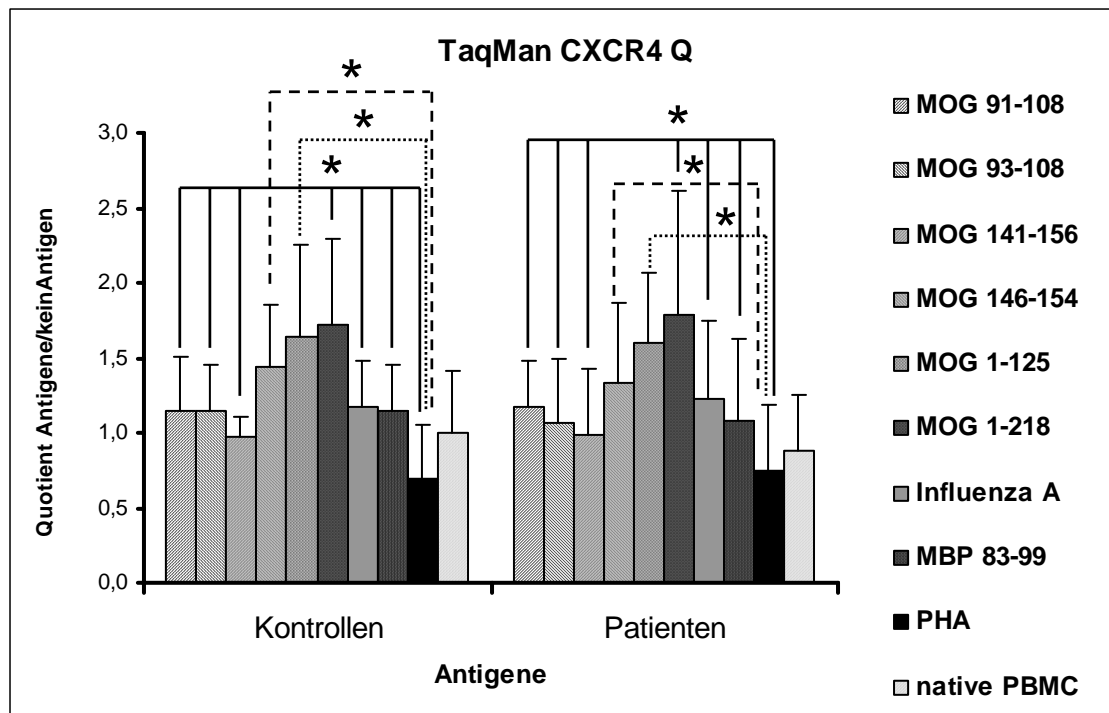


Abb. 4b. CXCR4 – Induktion nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen

Gezeigt ist eine abgewandelte Form der Abbildung 4a.

Die Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte der einzelnen Patienten und Kontrollpersonen für die einzelnen Antigene wurden durch die Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte der 'kein Antigen'-Kontrollen jeweils der Patienten- oder Kontrollgruppe geteilt, außerdem sind die Standardabweichungen dargestellt. Das Kontrollenkollektiv umfasste 13 Personen, das Patientenkollektiv 20 Personen.

Dargestellt sind die Ergebnisse nach Stimulation mit MOG 91-108, MOG 93-108, MOG 141-156, MOG 146-154, MOG 1-125, MOG 1-218, Influenza A-Peptid, MBP 83-99, PHA und die Werte der nativen PBMC in Relation zur Medium-Kontrolle. (* = signifikanter Unterschied, $P < 0,05$)

Es ist zu erkennen, dass die Antigene MOG 1-125 und MOG 1-218 zu einer gesteigerten Induktion von CXCR4 führten und zu einem geringeren Maß auch MOG 146-154, während PHA zu einer verminderten Induktion führte. Die übrigen Antigene zeigten gegenüber der Medium-Kontrolle keine deutlich erhöhte oder verminderte Induktion.

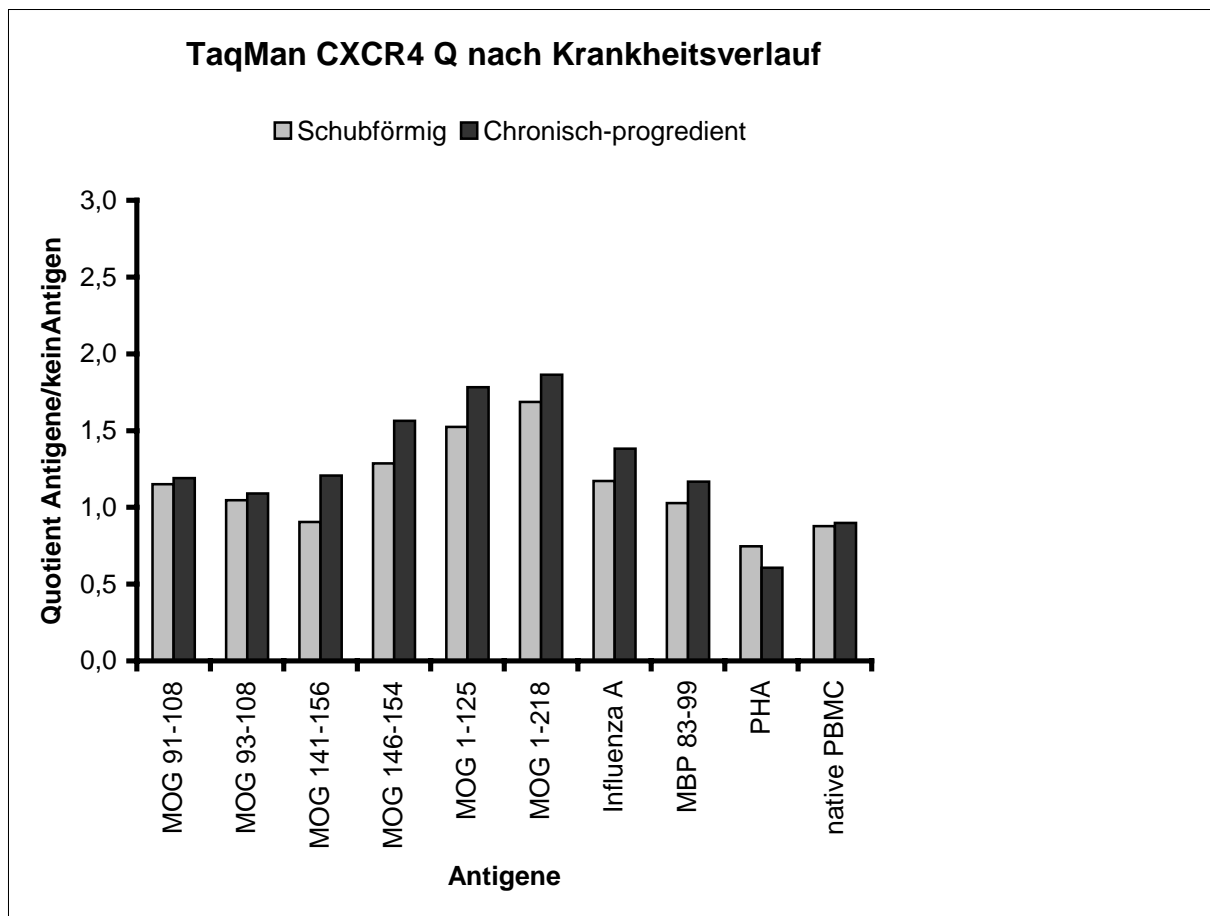


Abb. 5. CXCR4 – Induktion nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen

Gezeigt ist der Vergleich zwischen den Patienten mit schubförmigem Verlauf und den Patienten mit chronisch-progredientem Krankheitsverlauf innerhalb der Patientengruppe aus den beiden vorherigen Diagrammen. Wie in Abbildung 4b wurde ein Quozient gebildet aus den Mittelwerten der $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ -Werte der unterschiedlichen Antigene und den Mittelwerten der $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ -Werte der Negativkontrolle.

Das Kollektiv der schubförmigen Patienten umfasste 13 Personen, das der chronisch-progredienten Patienten 6 Personen.

Dargestellt sind wieder die Ergebnisse nach Stimulation mit MOG 91-108, MOG 93-108, MOG 141-156, MOG 146-154, MOG 1-125, MOG 1-218, Influenza A-Peptid, MBP 83-99, PHA und die 'ohne Inkubation'-Negativkontrolle.

Es sind keine deutlichen Unterschiede bei der CXCR4-Induktion zwischen den beiden Krankheitsverläufen zu erkennen.

3.2.2. CXCR4-Expression nach Stimulation mit MOG-Antigenen (FACS)

Nach der Messung der CXCR4-Induktion durch MOG und andere Antigene mit Hilfe der TaqMan-PCR wurde, wie bei CXCR3, anschließend die CXCR4-Expression auf Lymphozyten im Durchflußzytometer (FACS) bestimmt, um zu sehen, ob auch wirklich die Rezeptoren gebildet und exprimiert werden, und um die Ergebnisse der TaqMan-PCR Experimente zu bestätigen oder zu ergänzen.

Es wurden wiederum PBMC von MS-Patienten und Kontrollpersonen mit verschiedenen Antigenen in einer Zellkultur stimuliert. Anschließend wurden die PBMC mit Antikörpern gegen CXCR4 markiert und die Zahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit der FACS-Methode gemessen.

Als Antigene wurden MOG 91-108, MOG 141-146, MOG 1-125 und MOG 1-218 verwendet, darüber hinaus MBP 83-99, Influenza A-Peptid und PHA als Positivkontrolle. Eine Probe war wieder die Medium-Negativkontrolle bzw. 'kein-Antigen'-Negativkontrolle.

Für die statistische Auswertung wurde, wie bei CXCR3, in jedes Histogramm ein Marker eingebaut, der 99% der gemessenen Intensität der unspezifischen Isotypenkontrolle des Medium-Kontroll-Ansatzes ausblendet, so dass für die Messung der spezifischen Ansätze nur die Ereignisse berücksichtigt wurden, die über der Intensität der Isotypen-Kontrolle lagen und somit die unspezifische Hintergrundintensität subtrahiert werden konnte.

Bestimmt wurden wieder die geometrischen Mittelwerte der Intensitäten der Ereignisse. Wiederum wurden die gemessenen geometrischen Mittelwerte der einzelnen Proben für die verschiedenen Antigene als Quotient in Relation zur jeweiligen Negativkontrolle gesetzt. Aus diesen Quotienten der geometrischen Mittelwerte wurde ein Mittelwert aus den Ergebnissen des Patienten- bzw. Kontrollgruppenkollektivs für jedes Antigen gebildet und in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 6). Die absoluten Werte der Negativkontrollen waren bei Patienten und Kontrollen gleich groß (nicht dargestellt).

Die Patientengruppe umfasste 6 Personen, die Kontrollgruppe 4 Personen. Aufgrund des relativ kleinen Kollektivs konnte die Patientengruppe nicht mehr weiter nach dem Krankheitsverlauf geteilt und getrennt untersucht werden. Trotz des verhältnismäßig kleinen Kollektivs sind die Ergebnisse aussagekräftig, da die Werte auch hier sehr homogen waren und es keine großen Abweichungen gab.

Verglichen wurden wieder Unterschiede bei den einzelnen Antigenen zwischen Patienten und Kontrollpersonen und Unterschiede zwischen den einzelnen Antigenen untereinander.

Ergebnisse:

Sowohl bei der Patientengruppe als auch bei der Kontrollgruppe sind die Expressionen von CXCR4 nach Stimulation mit PHA deutlich geringer als bei der Negativkontrolle und allen anderen Antigenen. Bei der Patientengruppe ist dieser Unterschied zu allen anderen Antigenen signifikant ($P < 0,05$). Bei der Kontrollgruppe ist der Wert von PHA signifikant niedriger als die von MOG 91-108, MOG 1-125 und MBP 83-99 ($P < 0,05$) und fast signifikant niedriger als MOG 141-156 ($P = 0,112$) und Influenza A ($P = 0,081$).

Bei der Patientengruppe unterschieden sich die Werte der anderen Antigene nur sehr gering von der Negativkontrolle und untereinander.

Bei der Kontrollgruppe waren die Werte nach Stimulation mit MOG 91-108, MOG 1-125 und MBP 83-99 auf fast dem gleichen Niveau wie die Negativkontrolle. Nach Stimulation mit MOG 141-156 und Influenza A lagen die Werte etwas niedriger, nach Stimulation mit MOG 1-218 war die Expression von allen Antigenen, abgesehen von PHA, am niedrigsten. Die Unterschiede zur Negativkontrolle oder untereinander waren nicht signifikant.

Zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe war nur der Unterschied nach Stimulation mit MOG 1-218 signifikant, das bei der Patientengruppe etwa Werte auf dem Niveau der anderen Antigene und der Negativkontrolle hatte, während es bei der Kontrollgruppe zu einer niedrigeren Expression führte.

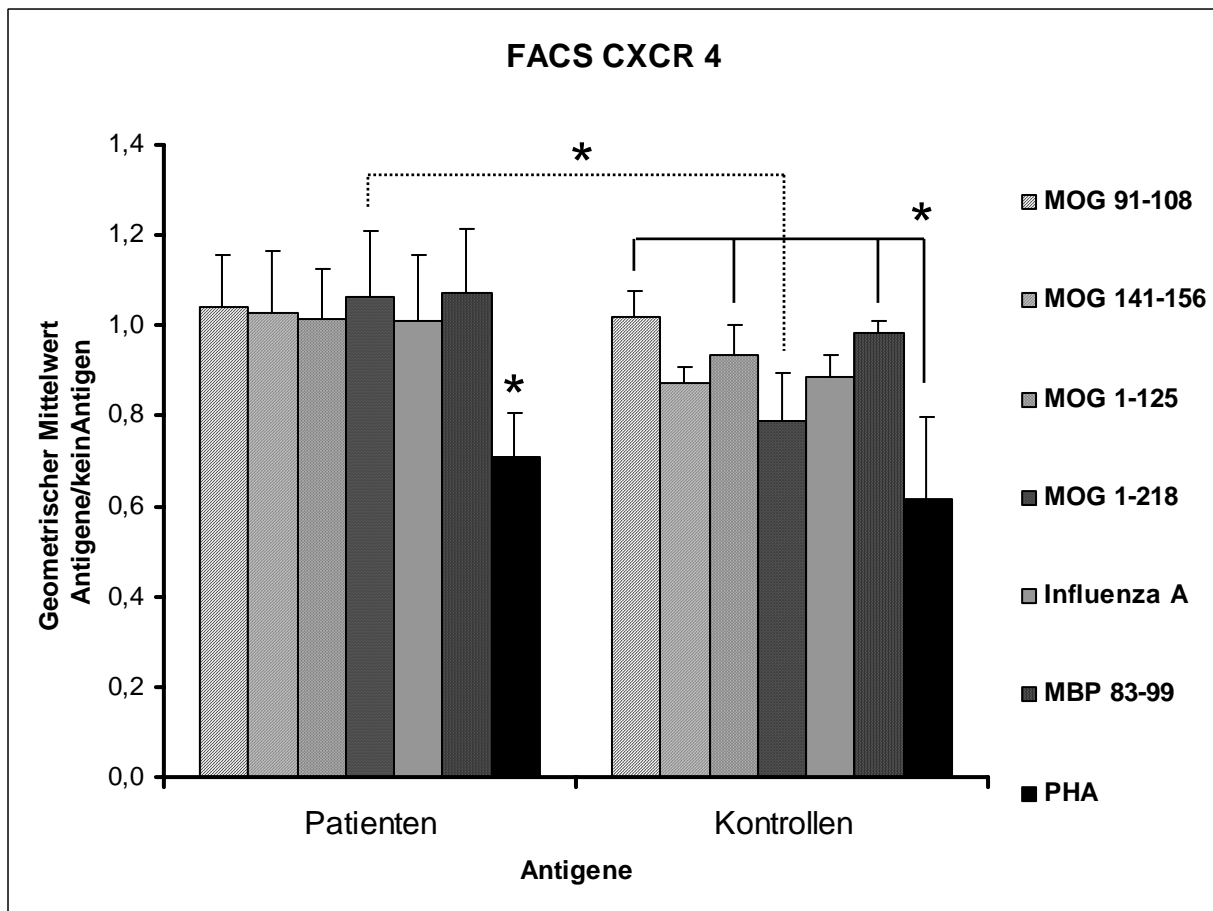


Abb. 6. CXCR4-Expression nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen

Gezeigt sind die Mittelwerte der CXCR4-Expression von 6 Patienten und 4 Kontrollen für jedes Antigen, gemessen durch FACS.

Stimuliert wurde mit MOG 91-108, MOG 141-156, MOG 1-125, MOG 1-218, Influenza A-Peptid, MBP 83-99 und PHA.

Es wurde ein Quozient aus den geometrischen Mittelwerten der einzelnen Antigene und der 'kein Antigen'-Kontrolle gebildet.

Beim Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen ist einzig die Expression von CXCR3 nach Stimulation mit MOG 1-125 signifikant erhöht ($P < 0,05$).

Zwischen den einzelnen Antigenen innerhalb der beiden Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen. (* = signifikanter Unterschied, $P < 0,05$)

(PHA ist bei den Patienten gegenüber allen anderen Antigen signifikant erhöht)

Tabelle 6 (Anhang) zeigt alle Geometrischen Mittelwerte, die in Abbildung 3 eingegangen sind. Daneben sind auch die Prozentwerte angegeben, die ausagen, wie viele Zellen von allen getageten Zellen innerhalb des Markers lagen.

3.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse für CXCR4

Sowohl bei den TaqMan-PCR als auch bei den FACS-Untersuchungen führte eine Stimulation mit dem Mitogen PHA zu einer Downregulation der CXCR4-Rezeptoren, sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen.

Es ist ausgeschlossen, dass das PHA nicht funktionsfähig war, da die Proben für die Untersuchungen von CXCR3 und CXCR4 identisch waren und es bei CXCR3 erwartungsgemäß zu einer deutlichen Induktion führte.

Bei den anderen Antigenen gab es, wie beim PHA, fast keine Unterschiede zwischen den Patienten- und Kontrollgruppen:

Bei den TaqMan-PCR Untersuchungen gab es keine Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen und auch nicht innerhalb der Patientengruppe bei unterschiedlichem Krankheitsverlauf.

Bei den FACS Untersuchungen gab es bei fast allen Antigenen keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Einzig bei MOG 1-218 waren die Unterschiede bei den FACS Untersuchungen signifikant zwischen den Patienten und den Kontrollen. Während die Expression bei den Patienten auf dem Niveau der anderen Antigene und der Negativkontrolle lag, war die Expression bei den Patienten deutlich niedriger.

Die TaqMan-PCR und die FACS Untersuchungen ergaben unterschiedliche Ergebnisse bei den Stimulationen mit den verschiedenen Antigenen, wobei diese Ergebnisse sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen zu sehen sind.

Bei den TaqMan-PCR Untersuchungen konnten die Antigene MOG 146-154 und insbesondere MOG 1-125 und MOG 1-218 eine erkennbare Induktion bewirken, während bei den FACS Untersuchungen in der Patientengruppe kein Antigen zu einer erkennbaren Expressionssteigerung führte. In der Kontrollgruppe führten die Antigene MOG 141-156 und MOG 1-218 sogar zu einer verminderten Expression. Die übrigen Antigene bewirkten keine deutliche Veränderung gegenüber den Negativkontrollen.

3.2. Vergleich der Expression zwischen CXCR3 und CXCR4 bei nativen PBMC, nach Stimulation mit Myelinantigenen und Stimulation mit dem Mitogen PHA

Während man in nativen PBMC nur wenig CXCR3-mRNA findet ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte von ca. 0,5), wird der Rezeptor alleine durch die Zellkultur im Medium hochreguliert ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte von ca. 1,5). Bei den großen MOG-Peptiden werden Werte von 3 bzw. 3,7 erreicht und nach Stimulation mit PHA sogar Werte von 5 bis 6. Auch im FACS ist diese Hochregulation zu sehen. Während die in Medium kultivierten PBMC nur zu ca. 25% CXCR3 exprimieren, sind es nach Stimulation mit den großen MOG-Peptiden 35% und nach Stimulation mit PHA sogar 45 - 50% (siehe Tabelle 3).

Bei CXCR4 sind die Verhältnisse vor und nach Stimulation im Vergleich zu CXCR3 völlig unterschiedlich. CXCR4 wird auf ruhenden Lymphozyten in hohen Zahlen exprimiert (ca. 80% der Lymphozyten sind CXCR4-positiv). Nach Stimulation mit den Myelinantigenen bleibt die Zahl der CXCR4-positiven Zellen ungefähr gleich, bzw. nimmt tendentiell eher ab (siehe Tabelle 6). Nach Stimulation mit PHA kommt es jedoch zu einer deutlichen Rezeptor-runterregulation auf der Zelloberfläche (nur noch ca. 50% der Zellen sind CXCR4-positiv).

Auch auf mRNA-Ebene gibt es deutliche Unterschiede zwischen CXCR3 und CXCR4. Die basale Transkription nativer PBMC liegt mit $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werten von ca. 2 deutlich höher als bei CXCR3. Die Kultivierung in Medium allein führt zu keiner verstärkten Induktion. Die Stimulation mit den großen MOG-Peptiden führt zu einer Induktion auf Werte von ca. 3,8 - 4,5, während die Stimulation mit PHA zu einer verminderten Transkription mit Werten von ca. 1,7 - 1,8 führt.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal das Expressionsverhalten von Chemokinrezeptoren mononukleärer Zellen aus peripherem venösem Blut nach Stimulation mit autoantigenen Myelinpeptiden untersucht.

Die ausgewählten Rezeptoren waren CXCR3, für den in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte, dass er mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS spielt, und CXCR4, der bislang praktisch noch nicht in Verbindung mit der Pathogenese der MS untersucht worden ist und daher auch (noch) nicht als bedeutender Faktor bei der MS angesehen worden ist.

Die vorliegende Studie konnte zwar bei beiden Chemokinrezeptoren nur wenige Unterschiede zwischen der Patientengruppe und den gesunden Kontrollen feststellen. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Stimulation mit Myelinantigenen bei beiden Rezeptoren zu Reaktionen in Form einer Hochregulierung geführt hat.

Die erzielten Ergebnisse konnten nicht nur untermauern, dass CXCR3 ein wichtiger Chemokinrezeptor in der Pathogenese der MS ist, sondern auch Hinweise liefern, dass auch CXCR4 eine wichtige Rolle spielen könnte.

Aus den hier präsentierten Ergebnissen und den zuvor erlangten Erkenntnissen anderer Forschungsgruppen konnten neue Theorien über die Pathogenese der MS formuliert werden.

4.1. CXCR3

4.1.1. Expression von CXCR3 auf nativen PMBC ist bei Patienten mit unterschiedlichem Verlauf und Kontrollen gleich.

Die Untersuchungen der nativen, unstimulierten PBMC ergab, dass sich die Expressionen von CXCR3 bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen nicht signifikant unterschieden, sowohl auf mRNA- als auch auf Rezeptorebene. Es gab auch keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit schubförmigem und Patienten mit chronisch-progredientem Krankheitsverlauf.

Die Expression von CXCR3 auf unstimulierten Lymphozyten aus peripherem Blut und Liquor bei Patienten und Kontrollen wurde schon von vielen Forschungsgruppen untersucht. Dabei wurden zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt, die in Tabelle 7 zusammengetragen sind. Im peripheren Blut lagen die Werte zwischen 3% CXCR3-positiver Zellen (Teleshova et al., 2002) und 84% (Sörensen et al., 1999; Sindern et al., 2002). Die sehr unterschiedlichen Werte wurden von den Autoren zum Teil damit erklärt, dass hohe Prozentzahlen in den Studien erzielt wurden, bei denen Patienten untersucht wurden, die in den letzten Tagen einen Schub erlitten (Kivisäkk et al., 2002; Sindern et al., 2002; Sörensen et al., 1999, 2002). Das erklärt aber nicht die hohen Werte in den Kontrollgruppen, die jeweils gleich waren wie die bei den Patienten. Es wurde auch versucht, die unterschiedlichen Ergebnisse darauf zurückzuführen, dass bei manchen PBMC durch Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation, bei anderen aus Vollblut isoliert wurden und bei manchen PBMC zuvor tiefgefroren waren. Kivisäkk et al. konnten aber zeigen, dass die unterschiedlichen Verfahren fast keinen Einfluss auf die Expression hatten (Kivisäkk et al., 2002). Eventuell sind die Unterschiede auf unterschiedliche Markerantikörper zurückzuführen.

Übereinstimmend wurde aber bei allen gezeigt, dass der Anteil der CXCR3-positiven Zellen im Liquor deutlich höher liegt als im Blut, und dass CD8+ T-Zellen zu einem höheren Prozentsatz CXCR3 exprimieren als CD4+ T-Zellen.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit stand die Bestimmung der Prozentzahl der CXCR3+ Zellen an der Gesamtpopulation unstimulierter T-Zellen nicht im Vordergrund. Es sollte stattdessen untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen Patienten mit den verschiedenen Krankheitsverläufen und gesunden Kontrollen gibt. Es wurde gezeigt, dass es sowohl zwischen den unterschiedlichen MS-Formen als auch zwischen Patienten und Kontrollen keine Unterschiede gibt bei der CXCR3-Expression nativer PBMC.

Dies wurde auch in den meisten Publikation beschrieben (Kivisäkk et al., 2002; Martinez-Caceres et al., 2002; Misu et al., 2001; Sindern et al., 2002; Sörensen et al., 1999, 2002). Die einzigen Autoren, die in ihren Studien zu dem Ergebnis kamen, dass der Prozentsatz der CXCR3+ T-Zellen bei Patienten größer ist als bei der Kontrollgruppe sind Balashov et al. und Teleshova et al. (Balashov et al., 1998 ; Teleshova et al., 2002). Bei beiden wurden aber nicht die beiden T-Zellsubsets getrennt untersucht, und die Prozentzahlen waren so niedrig, dass bereits kleine Unterschiede signifikant wurden. Nebenbei waren bei beiden die Werte der schubförmigen und der chronisch-progredienten Patientengruppen gleich. Eikelenboom et al. stellten fest, dass bei ihren Experimenten die Zahl der CXCR3-positiven CD8+ T-Zellen bei den Patienten höher war als bei der Kontrollgruppe. Bei CD4+ T-Zellen gab es dagegen keinen Unterschied. Auch in dieser Studie gab es keinen Unterschied zwischen den einzelnen Patientenuntergruppen (Eikelenboom et al., 2002).

Zang et al. kamen bei ihren Untersuchungen der CXCR3-Transkripte mit Hilfe einer semiquantitativen PCR, bei der die PCR-Produkte mit einem Densitometer gemessen wurden, auch zu dem Ergebnis, dass die Expression bei Patienten und Kontrollen fast gleich war (Zang et al., 2000).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der FACS-Untersuchung zeigten mit Werten von 26,7% bzw. 24,7% CXCR3-positiver unstimulierter Lymphozyten (siehe Tabelle 3) bei den Patienten und Kontrollen fast gleiche Werte für diese beiden Gruppen. Allerdings beziehen sich diese Werte auf die Mediumkontrolle, für die ja bei den TaqMan-PCR Untersuchungen gezeigt wurde, dass die Zellkultur alleine bereits zu einer Hochregulierung führt.

4.1.2. Unterschiedliche Expression nach Stimulation mit Antigenen zwischen Patienten und Kontrollen

Nach Stimulation mit MOG-Peptiden waren die Ergebnisse der TaqMan-PCR Untersuchungen und FACS Untersuchungen beim Vergleich zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe uneinheitlich.

Während die Ergebnisse der TaqMan-PCR Untersuchungen bei Patienten und Kontrollen bei jedem Antigen fast gleich waren, gab es bei den FACS Untersuchungen einen signifikanten Unterschied. MOG 1-125 führte bei der Patientengruppe zu einer signifikant höheren Induktion als bei der Kontrollgruppe. Auch bei den anderen Antigenen waren die Werte in den FACS Untersuchungen bei den Patienten leicht höher, allerdings nicht signifikant. Es muss jedoch gesagt werden, dass die Induktion von CXCR3 auf Rezeptorebene selbst durch PHA zwar erkennbar, aber nicht sehr ausgeprägt ist. Auch PHA, das bei den TaqMan-PCR Untersuchungen einen dreimal höheren Wert bei den Patienten, bei den Kontrollen sogar einen viermal höheren Wert gegenüber der Negativkontrolle erhöhen konnte, erreichte bei den FACS-Untersuchungen nur eine Erhöhung um den Faktor 1,52 bei den Patienten und 1,36 bei den Kontrollen. Bei den MOG-Peptiden lagen die Werte noch deutlich geringer. Auf die möglichen Ursachen für diese Diskrepanz wird später noch eingegangen.

Der signifikant höhere Wert nach Stimulation mit MOG 1-125 bei den Patienten ist also mit Vorsicht zu betrachten. Allerdings konnte auch bei den TaqMan-PCR Untersuchungen festgestellt werden, dass – trotz der ähnlichen absoluten Werte zwischen den beiden Gruppen – nur bei den Patienten die Unterschiede der Peptide MOG 1-125 und MOG 1-218 im Vergleich zu der Negativkontrollen signifikant war, nicht jedoch bei den Kontrollen.

Es kann also durchaus sein, dass die Reaktivität der PBMC der MS-Patienten größer ist als die der gesunden Kontrollen.

Es wurde zwar noch nie zuvor die Chemokinrezeptor-Induktionen nach Stimulation mit Myelinantigenen zwischen Patienten und Kontrollen verglichen. Nachdem aber bekannt war, dass auch gesunde Probanden T-Zellen besitzen, deren Rezeptoren spezifisch Myelinantigene erkennen (Kerlero de Rosbo et al., 1993; Martin et al., 1992 a; Olsson et al., 1992; Wallström et al., 1998; Weissert et al., 2002) wurden in einigen Studien die Reaktivitäten von PBMC von MS-Patienten mit denen von Kontrollen nach Inkubation mit MOG-Antigenen untersucht und verglichen. Für diese Untersuchungen wurden als Methoden entweder ELISPOT- oder Proliferations-Assays angewandt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren jedoch gegensätzlich. So konnten Kerlero de Rosbo et al. bei ihren Experimenten in der Tat eine höhere Reaktivität der MS-Patienten-Zellen feststellen, genauso wie Wallstrom et al. und Sun et al. (Kerlero de Rosbo et al., 1993, 1997 ; Sun et al., 1991 ; Wallström et al., 1998). Diaz-Villoslada et al. und Lindert et al. konnten jedoch diese Ergebnisse in ihren neueren Untersuchungen nicht bestätigen (Diaz-Villoslada et al., 1999; Lindert et al., 1999).

4.1.3. Deutliche Induktion von CXCR3 nach Stimulation mit MOG-Peptiden und PHA

Während die kürzeren MOG-Peptide und MBP 83-99 nur zu einer schwachen Induktion von CXCR3 führten, war bei den TaqMan-PCR Untersuchungen nach Stimulation mit den größeren MOG-Peptiden MOG 1-125 und MOG 1-218 eine deutliche Induktion zu erkennen. Bei MOG 1-125 wurden Werte erreicht, die doppelt so hoch waren wie die Negativkontrolle, bei MOG 1-218 waren die Werte sogar noch höher.

Die Stimulation mit PHA erreichte die höchste Induktion mit Werten von zirka drei- bis viermal so hoch wie die Negativkontrolle.

Bei den FACS Untersuchungen sind für diese beiden Peptide auch höhere Werte als bei den Negativkontrollen zu erkennen. Die Unterschiede sind jedoch nie signifikant und auch nicht sehr deutlich zu erkennen, bis auf die Expression von CXCR3 nach Stimulation mit MOG 1-125 bei den Patienten. Aber selbst hier ist die Expression nur um den Faktor 1,35 gegenüber der Negativkontrolle und nicht signifikant erhöht, bei MOG 1-218 nur um den Faktor 1,16 (bei den Patienten) bzw. 1,14 (bei den Kontrollen).

Nach Stimulation mit PHA lagen die Werte zwar signifikant höher als bei den Negativkontrollen, aber mit Erhöhungen um den Faktor 1,52 bzw. 1,36 bei Patienten und Kontrollen auch hier deutlich unter den Ergebnissen der TaqMan-PCR Untersuchung.

Wie ist diese Diskrepanz zwischen den beiden Untersuchungen zu erklären? Man kann natürlich nicht sagen, dass eine um den Faktor 2 erhöhte Transkription zu einer Verdopplung in der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche führen müsste, doch dieser Unterschied in den Zahlenwerten ist verwunderlich.

Es liegen bislang nur wenige Studien vor, in denen die CXCR3-Expression nach Stimulation gemessen wurde.

Loetscher et al. zeigten in ihren Experimenten, in denen sie native T-Zellen aus peripherem menschlichem Blut mit IL-2 oder IL-2 + PHA stimulierten, dass erst nach 10-15 Tagen eine deutlich gesteigerte Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche zu finden war. Nach 3 Tagen jedoch waren nur geringe Veränderungen zu sehen. Der Entzug von IL-2 führt wieder zu einer Herunterregulation der Rezeptoren. Interessanterweise führte eine weiterführende Stimulation mit anti-CD3 mit oder ohne anti-CD28 von Zellen, die bereits 13 Tage mit IL-2/PHA stimuliert worden waren und eine hohe Rezeptordichte aufwiesen, zu einer Hemmung der CXCR3-Expression und die Rezeptorzahlen gingen wieder zurück (Loetscher et al., 1998).

Qin et al. konnten in ihren Untersuchungen auch zeigen, dass CXCR3 zwar durch anti-CD3 hochreguliert werden kann, allerdings auch erst nach 5-8 Tagen. Auch nach IL-2-Stimulation wurde der Peak in dieser Studie erst nach 3 Wochen erreicht (Qin et al., 1998).

Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen könnten also erklären, warum bei den FACS Untersuchungen noch kein großer Effekt festzustellen war.

4.1.4. Modell des Pathomechanismus CXCR3-positiver T-Zellen in der MS

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse über die Induktion von CXCR3 durch MOG-Peptide tragen erheblich zum weiteren Verständnis der Rolle von CXCR3 bei der Pathogenese der MS bei, so dass – mit Einbindung der zuvor erlangten Kenntnisse über CXCR3 und die MS (siehe Einleitung) – eine abschließende Hypothese über den Pathomechanismus CXCR3-positiver Zellen im ZNS von MS-Patienten formuliert werden kann.

Es ist bekannt, dass CXCR3 nur in geringen Zahlen auf ruhenden T-Zellen zu finden ist, CXCR3 jedoch in großer Zahl auf der Oberfläche von Effektor-T-Zellen zu finden ist. Die Effektor-T-Zellen gehören dabei dem Th1-Subtyp an, der hauptsächlich für die Schäden an den Myelinscheiden und Axonen

verantwortlich gemacht wird. Untersuchungen an ZNS-Gewebsschnitten ergaben, dass CXCR3 in aktiven Läsionen auf T-Zellen und Astrozyten exprimiert wird. Daneben werden IP-10 und MIG, die Liganden von CXCR3, auch auf Astrozyten in der Nähe der Läsionen gefunden, nicht jedoch in unbeteiligter weißer Substanz.

Im Liquor wurden im Vergleich zum peripheren Blut erhöhte Zahlen CXCR3-positiver T-Zellen gefunden. In der Tat exprimieren nahezu 100% aller T-Zellen im Liquor CXCR3. Allerdings trifft dies auch auf gesunde Kontrollen zu. Diese Zellen gehören überwiegend dem Memory/Effektortyp der T-Zellen an, was wiederum bestätigt, dass CXCR3 fast nur auf aktivierten T-Zellen zu finden ist.

Es ist aber nicht verwunderlich, dass auch CXCR3-positive Zellen im Liquor gesunder Kontrollen gefunden werden. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass aktivierte T-Zellen unabhängig von ihrer Antigen-spezifität die Blut-Hirn-Schranke passieren können. Und dass CXCR3 kein spezifischer Chemokinrezeptor für ZNS-Erkrankungen ist, konnte dadurch gezeigt werden, dass auch die meisten aktivierten T-Zellen in entzündlichen Infiltraten in anderen Körperregionen CXCR3 exprimierten, so wird zum Beispiel auf 97% der T-Zellen in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis CXCR3 exprimiert (Qin et al., 1998). Diese Ergebnisse lassen aber die Aussage zu, dass die Expression von CXCR3 auf T-Zellen eine Voraussetzung für T-Zellen sein könnte, um ins ZNS immigrieren zu können.

Bei MS-Patienten und gesunden Kontrollen sind zwar der Anteil der CXCR3-positiven Zellen gleich, die absolute Zahl an T-Zellen ist jedoch bei MS-Patienten größer (Pleiozytose) (Sörensen et al., 2002).

Es konnte auch die Assoziation von CXCR3 und seinen Liganden in aktiven MS-Läsionen und deren positive Korrelation gezeigt werden. Darüber hinaus ist belegt worden, dass es im Parenchym gesunder Kontrollen und auch in nicht betroffenen Hirnregionen von MS-Patienten keine CXCR3-positiven Zellen und auch keine Liganden gibt.

Selbstverständlich gibt es auch im Kreislauf „gesunder“ Kontrollen, d. h. bei Menschen, die zwar nicht an MS erkrankt sind, aber dennoch mit dem Immunsystem das eine oder andere Agens abwehren müssen, aktivierte T-Zellen, die dann auch CXCR3 exprimieren. Auf der Suche nach ihrem Zielantigen durchlaufen sie den Körper und passieren auch die Blut-Hirnschranke. Da sie dort aber weder auf ihr Antigen treffen noch auf die erforderlichen Liganden, die die Zellen dort halten würden, wandern sie in den Liquor ab und von dort zurück in die Blutzirkulation. Die Zahl der Zellen, die im Liquor „gesunder“ Kontrollpersonen gefunden werden sind aber zahlenmäßig geringer.

Bei den MS-Patienten werden aber auch viele Zellen im Liquor gefunden und nicht nur in den Läsionen. Das liegt wohl daran, dass es dort auch aktivierte T-Zellen gibt, die nicht in ihr Zielantigen im ZNS finden können.

Warum können diese Zellen in den Liquor abwandern, wenn doch im ZNS von MS-Patienten die Liganden IP-10 und MIG präsent sind, um die aktivierten T-Zellen in den entzündlichen Herden zu halten?

Untersuchungen zeigten, dass die Zahl der T-Zellen in den entzündlichen Infiltraten im Vergleich zu anderen Zellen wie beispielsweise Makrophagen eher gering ist. Es ist also logisch zu folgern, dass nur die T-Zellen auch wirklich im ZNS gehalten werden, die spezifisch gegen die dort ansässigen Antigene vorgehen können. Wie aber wird gewährleistet, dass T-Zellen, die für andere Antigene spezifisch sind, wieder zurück in die Zirkulation abwandern können?

Hier könnten die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse den entscheidenden Hinweis liefern. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation, d. h. eine Präsentation von MOG-Antigenen an T-Zellen zu einer Aktivierung und zu einer Hochregulierung von CXCR3 führt, zumindest auf mRNA-Ebene. Auf Rezeptorebene war zwar auch eine Hochregulierung feststellbar, jedoch nur mäßig. Frühere Stimulationsversuche zeigten bereits, dass eine Stimulation über mehrere Tage nötig ist, um eine deutliche Hochregulation von CXCR3 zu erreichen.

Für die FACS-Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen für 48 Stunden mit den verschiedenen Antigenen stimuliert. Das ist genau die Dauer, die T-Zellen im Lymphknoten dem präsentierten Antigen ausgesetzt sind, bevor sie den Lymphknoten verlassen, wie in vivo Studien ergaben (Mackay et al., 1992).

Es ist also denkbar, dass das Priming der T-Zellen im Lymphknoten, wenn ihnen ihr Antigen von Antigenpräsentierenden Zellen präsentiert wird, zu einer nur mäßigen Hochregulation von CXCR3 führt, die aber gerade ausreicht, um die Blutbahn durch die Blut-Hirn-Schranke verlassen zu können. Dort treffen die aktivierten Zellen wieder auf ihr Antigen und werden weiter stimuliert, woraufhin sie die CXCR3-Expression weiter hochfahren. Diese Hochregulierung ist vielleicht die entscheidende Voraussetzung dafür, dass die T-Zellen an der Stelle der Inflammation gehalten werden können und nicht wieder zurück in den Blutkreislauf abdriften.

Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine fortführende Stimulation der T-Zellen über 2 Wochen hinaus wieder mit einer Herunterregulierung der CXCR3-Expression einhergeht. Dieser Verlauf könnte klinisch als Remission in Erscheinung treten.

Ob diese Überlegungen zutreffen, wird in weiteren Studien zu untersuchen sein. Dazu wäre beispielsweise interessant zu sehen, ob die T-Zellen in den aktiven Läsionen tatsächlich mehr CXCR3 exprimieren als die Zellen im Liquor.

4.2. CXCR4

4.2.1. Expression von CXCR4 auf nativen PMBC ist bei Patienten mit unterschiedlichem Verlauf und Kontrollen gleich.

Die Untersuchungen der nativen, unstimulierten PBMC ergaben, dass sich die Expressionen von CXCR4 bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen nicht signifikant unterschieden, sowohl auf mRNA- als auch auf Rezeptorebene. Es gab auch keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit schubförmigem und Patienten mit chronisch-progredientem Krankheitsverlauf. Mit den für diese Arbeit gewählten Untersuchungsmethoden menschlicher Zellen aus peripherem Blut ist also nicht ein ähnliches Ergebnis erzielt worden wie bei den Gene-Chip Untersuchungen an gesunden und EAE-Ratten. Dort konnte man feststellen, dass in den lymphatischen Organen der kranken Tiere CXCR4 in einer höheren Zahl als bei den gesunden Tieren exprimiert wurde. Über den Grund für diesen Unterschied zwischen den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit und den Ratten-Untersuchungen kann man nur Vermutungen anstellen. Der Grund liegt vermutlich nicht darin, dass die Zellauftrennung mit Ficoll oder die anschließende Zellkultur zu einer Hochregulation oder Herunterregulation von CXCR4 in den Zellen führt (siehe unten). Es ist jedoch durchaus denkbar, dass sich die Expression von CXCR4 – sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen – zwischen peripherem Blut und lymphatischen Organen erheblich unterscheidet.

Der CXCR4-Rezeptor ist bis heute fast noch nie mit der MS in Verbindung gebracht worden. In nur zwei Studien wurde die CXCR4-Expression, neben anderen Chemokinrezeptoren, zwischen MS-Patienten und Kontrollen verglichen. Beide kamen bei ihren FACS-Untersuchungen auch zu dem Ergebnis, dass der Anteil an CXCR4-positiven T-Zellen bei Patienten mit unterschiedlichem Verlauf und Kontrollen immer gleich war (Balashov et al., 1999; Martinez-Caceres et al., 2002). Untersuchungen von dendritischen Zellen aus peripherem Blut auf ihre CXCR4-Expression ergaben auch keine Unterschiede zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen (Pashenkov et al., 2002).

Die native, unstimulierte Lymphozytenpopulation aus Vollblut wies bei FACS-Untersuchungen eine Expression von ca. 80% auf (unveröffentlichte Daten der Forschungsgruppe Weissert von ca. 50 Patienten und 20 Kontrollen). Diese Daten gleichen denen aus anderen Forschungsgruppen (Bermejo et al., 1998; Förster et al., 1998, Lee et al., 1999).

Auch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bei der FACS-Untersuchung von CXCR4 ergaben Werte von 40-90% bei den Patienten und 80% bei den Kontrollen für T-Zellen (siehe Tabelle 6), allerdings nach Ficoll-Dichtegradientenauffrennung von PBMC aus Vollblut. Bermejo et al. konnten dagegen zeigen, dass sich die Rezeptorexpression der T-Zellen nach Ficoll-Hypaque-Gradienten-Isolation nicht von T-Zellen aus Vollblut unterschied (Bermejo et al., 1998).

Einige Gruppen untersuchten auch die Subpopulationen von PBMC und kamen übereinstimmend zu folgenden Ergebnissen: 70-90% der naiven T-Zellen (sowohl CD4+ als auch CD8+), 20-40% der Gedächtnis-T-Zellen, 90% der B-Zellen, 75% der Makrophagen und nahezu 0% der natürlichen Killerzellen exprimieren CXCR4 (Förster et al., 1998, Lee et al., 1999). Allerdings kamen Bermejo et al. zu dem Ergebnis, dass sowohl naive T Zellen als auch Gedächtnis-T-Zellen zu ca. 80% CXCR4 exprimieren (Bermejo et al., 1998).

4.2.2. Expression von CXCR4 auf mit Antigenen stimulierten, aktivierten PBMC ist auch bei allen Gruppen gleich

Auch nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen oder PHA in einer Zellkultur waren keine signifikanten Unterschiede in der CXCR4-Expression bei Patienten mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf und gesunden Kontrollen feststellbar, sowohl bei den TaqMan-PCR- als auch bei den FACS-Untersuchungen. Die einzige Ausnahme war die Expression von CXCR4 im FACS nach Stimulation mit MOG 1-218, die bei den Patienten die gleichen Werte aufwies wie die anderen Antigene, bei den Kontrollen jedoch deutlich niedriger war. Da sich aber die Werte bei den anderen Antigenen und auch von MOG 1-218 bei der TaqMan-PCR Untersuchung bei den verschiedenen Gruppen nicht unterschieden, kann man wohl davon ausgehen, dass es sich um einen Zufallsbefund handelt. Zumal der Unterschied zwischen diesen Proben, die mit MOG 1-218 stimuliert wurden, und der Mediumkontrolle bei den Kontrollen nicht signifikant war.

Auf die Ergebnisse, die sich bei Untersuchungen der Reaktivität gegenüber MOG und anderen Myelinproteinen bei PBMC von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen ergaben, ist bereits bei der Diskussion der Ergebnisse von CXCR3 eingegangen worden.

Die Stimulation und Aktivierung von PBMC lässt keinen Unterschied in der reaktiven Expression von CXCR4 bei Patienten und Kontrollen erkennen.

4.2.3. Die Stimulation mit Antigenen oder PHA ergab verschiedene Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Expression von CXCR4 auf PBMC nach Stimulation mit MOG-Peptiden oder MBP-Peptiden untersucht. Auf die Ergebnisse wird später näher eingegangen.

Die TaqMan-Werte der Mediumkontrollen waren gegenüber den nativen PBMC nur ganz gering erhöht, was darauf hindeutet, dass die Zellkultur alleine zu keiner Veränderung der CXCR4-Expression auf mRNA-Ebene führt. Dies wurde auch bei TaqMan-Untersuchungen an CXCR4 von anderen Forschungsgruppen festgestellt (Jinquan et al., 1999).

Verschiedene Forschungsarbeiten beschäftigten sich bereits mit dem Expressionsverhalten von CXCR4 auf T-Zellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen und anderen Zellen des Immunsystems nach Stimulation mit verschiedenen T-Zellaktivatoren. Dabei kamen häufig gegensätzliche Ergebnisse heraus.

In dieser Arbeit ergab die Stimulation von PBMC mit PHA sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Rezeptorebene eine deutliche, gegenüber der Negativkontrolle signifikante, Downregulation von CXCR4.

Es ist ausgeschlossen, dass das PHA nicht funktionsfähig war, da die Proben für die Untersuchungen von CXCR3 und CXCR4 identisch waren und es bei CXCR3 erwartungsgemäß zu einer deutlichen Induktion führte.

Zwei Studien aus dem Jahr 1997 kamen bei Untersuchungen der Wirkung von PHA auf die Expression von CXCR4 bei isolierten T-Zellen zu dem Ergebnis, dass PHA CXCR4 stark induziert (Carroll et al., 1997; Bleul et al., 1997). Carroll et al. stimulierten dabei CD4+ T-Zellen mit PHA und IL-2 zusammen für 24-72 Stunden. Danach wurde die mRNA mit einer einfachen PCR und einem Northern Blot gemessen. Diese Methode ist jedoch nicht quantitativ und gegenüber der TaqMan-PCR nicht sehr aussagekräftig. Daneben wurden in dieser Veröffentlichung keine Angaben darüber gemacht, wie viele Proben untersucht wurden.

Bleul et al. stimulierten auch isolierte T-Lymphozyten mit PHA und auch, hier jedoch in getrennten Proben, mit IL-2 für 72 Stunden. Auch diese Forschungsgruppe stellte eine Hochregulierung in beiden Fällen fest. Untersucht wurde in

dieser Arbeit mit der FACS-Methode. Es wurden allerdings nur drei Experimente durchgeführt und deren Ergebnisse veröffentlicht.

Eine neuere Forschungsarbeit ergab jedoch, wie in der hier vorliegenden Arbeit, eine Downregulation von CXCR4 nach Stimulation mit PHA (Bermejo et al., 1998).

Auch für die Stimulation mit IL-2 gibt es andere Ergebnisse. Bei Mo et al. führte die Stimulation mit IL-2 zu einer mäßigen Herunterregulierung von CXCR4 auf CD4+ Zellen (Mo et al., 1998). Jourdan et al. konnten keinen Effekt von IL-2 auf die Rezeptor-Expression (FACS) von isolierten T-Zellen feststellen, genauso wie Jinqun et al. (Jinqun et al., 1999; Jourdan et al., 1998).

Der überwiegende Teil der Autoren ist der Auffassung, dass CXCR4 nur auf naiven oder ruhenden T-Zellen exprimiert wird, nicht jedoch, oder in nur sehr geringer Zahl, auf aktivierten T-Zellen (Baggiolini 1998; Luster, 1998; Sallusto et al., 1999). Von diesem Standpunkt wäre es logisch, wenn PHA und IL-2 zu einer Herunterregulation von CXCR4 führen würden. Jedoch wird dies, wie bereits erläutert, kontrovers diskutiert.

Die Regulation von CXCR4 durch Zytokine und andere Mediatoren scheint sehr komplex zu sein. Es wurde gezeigt, dass IL-4 die Expression von CXCR4 bei T-Zellen hochreguliert, während IL-10 die Expression herunterreguliert (Jinqun et al., 1999; Jourdan et al., 1998). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wird CXCR4 keinem speziellen T-Zellsubtyp zugeordnet, weder Th1 noch Th2-Zellen (Bonecchi et al., 1998), wobei auch das in der Literatur unterschiedlich beschrieben ist, und manche Autoren CXCR4 dem Th2-Subtyp zuschreiben (Annunziato et al., 1998). Die zwei genannten Zytokine gehören jedoch beide zu den Th2-Zytokinen, regulieren aber CXCR4 bei T-Zellen gegensätzlich. Diese Einteilung der T-Zellen in Subtypen ist also zu einfach, um Reaktionen von T-Zellen und deren Expressionsverhalten zu klassifizieren. Für IL-5 und TNF- α wurde kein Effekt festgestellt, bei IFN- γ eine leichte Hochregulation, die aber nicht signifikant war (Jinqun et al., 1999).

Unter welchen Bedingungen CXCR4 hoch- oder herunterreguliert wird, ist also noch lange nicht vollständig geklärt, und auch nicht, ob dieser Rezeptor vordringlich von einem bestimmten T-Zelltyp exprimiert wird.

Die Stimulation mit den MOG-Antigenen führte auf mRNA-Ebene - je nach Antigen in einem unterschiedlichen Ausmaß - zu einer Induktion von CXCR4. Bei Untersuchung der Expression von CXCR4 auf der Zelloberfläche mit der FACS-Methode wurde gegenüber der Mediumkontrolle keine Veränderung der Expression festgestellt, sie war evtl. sogar leicht vermindert.

Diese Konstellation kann nicht eindeutig erklärt werden. Es gibt hierfür zwei Erklärungen.

(1) Zum einen ist es denkbar, dass die Stimulation mit den Antigenen zu einer Aktivierung der T-Zellen führte, wodurch CXCR4 induziert wurde. Für diese Annahme spricht, dass die Induktionswerte bei den unterschiedlichen Antigenen in der Relation zueinander dem Bild bei CXCR3 entspricht, d. h. die kleinen Antigene konnten fast keinen Effekt erzielen, die größeren MOG-Peptide (MOG 1-125 und MOG 1-218) konnten eine deutliche Induktion bewirken. Nur MOG 146-154 von den kleineren MOG-Peptiden konnte eine höhere Induktion von CXCR4 gegenüber der Mediumkontrolle bewirken. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Wenn aber die MOG-Antigene über eine Aktivierung zu einer CXCR4-Induktion führen, warum wird CXCR4 nicht auch durch PHA hochreguliert? Dies könnte dadurch erklärt werden, dass PHA und Antigene, die von APC über den MHC-Komplex präsentiert werden, über unterschiedliche Mechanismen T-Zellen stimulieren. PHA wirkt als Mitogen und nicht über den T-Zell-Rezeptor.

Bleul et al. kamen in ihren Untersuchungen auch zu dem Ergebnis, dass PHA und IL-2 zu einer Hochregulation von CXCR4 bei T-Zellen führen. Sie untersuchten in der gleichen Studie auch die Wirkung von anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern, die zusammen den T-Zell-Rezeptor (CD3) und den Rezeptor

für das co-stimulatorische Signal (CD28) aktivieren, auf die CXCR4-Expression. Sie kamen auch hier zu dem Ergebnis, dass CXCR4 hochreguliert wird (Bleul et al., 1997). Jourdan et al. zeigten jedoch wiederum, dass bei ihren Untersuchungen anti-CD3/anti-CD28 zu einer Herunterregulation von CXCR4 führt und entkräfteten das zuvor erzielte Ergebnis (Jourdan et al., 1998).

Es gibt also auch hier keine Klarheit darüber, ob eine Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor, zu einer Hochregulierung von CXCR4 führt oder nicht.

Interessant ist jedoch, dass die Hochregulierung von CXCR4 durch die MOG-Peptide, die auf mRNA-Ebene konstatiert werden konnte, nicht auch auf Rezeptorebene festgestellt werden konnte. Eine Erklärung dafür wäre, dass der Effekt der Hochregulierung nur wenige Stunden anhält und nach 48 Stunden Inkubationszeit auf der Zelloberfläche nicht mehr detektierbar ist. Wahrscheinlicher ist aber, dass die Rezeptoren zwar durch Transkription der mRNA gebildet werden, dann aber im Zytosol verweilen und nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden. Bermejo et al. konnten zeigen, dass Lymphozyten aus peripherem Blut nur wenig CXCR4 an der Zelloberfläche exprimieren, aber alleine die Zellkultur führt zu einer vermehrten Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche (Bermejo et al., 1998). Dies wurde auch von Jourdan et al. festgestellt (Jourdan et al., 1998). Bermejo et al. stellten darüber hinaus fest, dass fast alle Lymphozyten CXCR4-Rezeptoren in ihrem Zytosol aufweisen, die in SDF-1-freier Zellkultur an die Oberfläche gebracht werden. Sie zeigten außerdem, dass sowohl der Ligand SDF-1, als auch das Mitogen PHA, als auch ein anti-CD3-Antikörper, der den T-Zell-Rezeptor aktivieren kann, zu einer deutlichen Herunterregulation der CXCR4-Rezeptoren auf der Oberfläche führen. Bei SDF-1 nahm gleichzeitig die Konzentration der Rezeptoren im Zellinneren leicht zu, was darauf hindeutet, dass die Rezeptoren durch Endozytose ins Zytoplasma aufgenommen wurden, um dann wieder, wenn wenig SDF-1 im extrazellulären Raum um den Lymphozyten vorhanden ist, an der Oberfläche exprimiert zu werden. Bei PHA und anti-CD3 fand man auch die Rezeptoren im Zytoplasma, aber im Vergleich zu SDF-1 und zu unbehandelten Zellen bei einer geringeren Zellzahl. Darüber hinaus war auch die Konzentration geringer. Das ließe sich dadurch erklären, dass PHA zusätzlich die

Transkription von CXCR4 hemmt, was auch durch die Ergebnisse der TaqMan-PCR Untersuchung bei PHA-stimulierten PBMC in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte.

Nach Stimulation mit Myelinantigenen kommt es so vielleicht zu einer vermehrten Transkription der CXCR4-DNA, die Rezeptoren verweilen aber im Zytosol. Bermejo et al. zeigten aber, dass es auch nach Aktivierung mit anti-CD3-Antikörpern zu einer verminderten Rezeptor-Konzentration in der Zelle kommt, d. h. eine Aktivierung über den T-Zellrezeptor alleine ist wohl nicht imstande, CXCR4 zu induzieren. Es ist allerdings möglich, dass ein kostimulatorisches Signal über CD28 und B7-Moleküle vorhanden sein muss, wie es bei der Aktivierung der Lymphozyten durch die Myelinantigene der Fall ist. Dies wurde von Bermejo et al. nicht untersucht.

So wäre die Hochregulation von CXCR4-mRNA nach Stimulation mit Myelinantigenen bei Lymphozyten zu erklären.

(2) Die andere Erklärung für die Ergebnisse ist, dass die Induktion von CXCR4 auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit MOG-Antigenen auf die Hochregulierung in der Monozyten/Makrophagen-Fraktion der PBMC zurückzuführen ist, und eine Stimulation und Aktivierung der Lymphozyten zu einer Herunterregulation von CXCR4 führt. Dass aktivierte T-Lymphozyten weniger CXCR4 exprimieren als naive T-Zellen ist die weitverbreitete Meinung in der Literatur (Baggiolini 1998; Bermejo et al., 1998; Luster, 1998; Sallusto et al., 1999). In diesem Fall würde die Stimulation mit MOG-Antigenen zu keinem Effekt in der Lymphozyten-Fraktion führen, allenfalls zu einer Herunterregulation, was das Ergebnis der FACS-Untersuchungen erklären könnte, bei der nur die Lymphozyten untersucht wurden. Jourdan et al. erwähnten in ihrer Publikation, dass eine Antigen-spezifische Stimulation von PBMCs eher zu einer Herunterregulation als zu einer Hochregulation geführt hat. Allerdings wurde nicht gesagt, welche Antigene verwendet wurden und die Ergebnisse wurden nicht veröffentlicht (Jourdan et al., 1998).

Interessanterweise wird die Expression bei Makrophagen genau gegensätzlich zu den T-Zellen reguliert. IL-4 führt bei Monozyten zu einer Herunterregulation, während IL-10 zu einer Hochregulation führt (Wang et al., 2001). Diese gegensätzliche Regulierung kann ein Hinweis darauf sein, dass bei Monozyten/Makrophagen eine Aktivierung zu einer Hochregulation von CXCR4 führt. Außerdem wird CXCR4 durch M-SCF, TGF- β und IFN- γ hochreguliert und durch IL-13 und GM-SCF herunterreguliert (Lee et al., 1999; Penton-Rol et al., 1998; Wang et al., 2001). Insbesondere die Tatsache, dass IFN- γ , der Hauptaktivator für Makrophagen, zu einer Hochregulation von CXCR4 führt, stützt diese Hypothese.

Der Effekt von PHA ist dennoch eine Herunterregulation bei der TaqMan-Untersuchungen, obwohl PHA ja auch Makrophagen über die Induktion von IFN- γ in T-Zellen aktivieren kann, wie die ELISPOT-Versuche zeigen (Weissert et al., 2002). Das liegt wohl daran, dass PHA in erster Linie zu einer Herunterregulation von CXCR4 bei T-Zellen führt. Lymphozyten machen 20-40% an den Leukozyten im peripheren Blut aus, Monozyten dagegen nur 2-4%. Dementsprechend stellen Monozyten bei den PBMC nur 10% dar und die Lymphozyten ca. 90% (wenn man die natürlichen Killerzellen nicht berücksichtigt, die aber nur einen kleinen Teil ausmachen). Der induzierende Effekt bei den Monozyten ist also in Addition weitaus geringer als der herunterregulierende Effekt bei den Lymphozyten. Man kann auch erkennen, dass die Herunterregulation bei den FACS-Untersuchungen, bei denen nur die Lymphozyten untersucht wurden, deutlicher ist als bei den TaqMan-PCR-Untersuchungen.

Diese Hypothese wird auch dadurch gestärkt, dass gezeigt werden konnte, dass dendritische Zellen, die bedeutendsten Antigen-präsentierenden Zellen, im peripheren Blut nur wenig CXCR4 exprimieren, nach ihrer Aktivierung und Reifung jedoch sehr viel mehr (Lee et al., 1999).

Die Hochregulation von CXCR4 in Monozyten infolge der Antigenaufnahme, deren Präsentation an Lymphozyten und die Aktivierung der Monozyten wiederum durch die Lymphozyten können bedeutend sein für das Trafficking

der Monozyten. Es ist beispielsweise denkbar, dass Makrophagen an der Entzündungsstelle Antigene an T-Lymphozyten präsentieren und daraufhin CXCR4 hochregulieren, wodurch ein Homing in die Lymphknoten zur weiteren Rekrutierung von Effektorzellen eingeleitet wird. Oder, wenn die Makrophagen noch nicht am Ort der Inflammation sind, kann die Rezeptorinduktion die Chemotaxis zum Ort der Entzündungsgeschehen initiieren.

Dass die CXCR4-Rezeptoren auf Monozyten/Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der MS spielen könnte, wird auch durch die Ergebnisse von Martinez-Caceres et al. gestützt, die zeigen konnten, dass Monozyten von MS-Patienten zu einem höheren Prozentsatz CXCR4-positiv sind und auch eine höhere durchschnittliche Fluoreszenzintensität aufweisen als Monozyten von gesunden Kontrollpersonen (Martinez-Caceres et al., 2002).

Zusammenfassend kann über CXCR4 festgestellt werden, dass sich die Expression bei Patienten und Kontrollen bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht unterschied.

Die Stimulation von PBMC mit Myelinautoantigenen führt auf mRNA-Ebene zu einer Hochregulation, in der Lymphozytenpopulation ist auf Rezeptorebene jedoch kein Effekt festzustellen. Die Stimulation mit PHA führt in beiden Untersuchungen zu einer deutlichen Herunterregulation. Diese unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Myelinautoantigenen und PHA und die Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsmethoden sind nicht eindeutig zu erklären. Es ist durchaus möglich, dass Myelinautoantigene zu einer Induktion von mRNA führen können, wobei dieser Effekt nicht auf der Zelloberfläche zu erkennen ist, evtl. deswegen, weil die Rezeptoren im Zytosol liegen. Vieles spricht aber auch dafür, dass die Hochregulation auf mRNA-Ebene durch die Makrophagen-Population der PBMC bedingt ist.

Insgesamt ist die Regulation des CXCR4-Rezeptors, sowohl bei Lymphozyten als auch bei Makrophagen, sehr komplex und bleibt weiterhin nicht einwandfrei geklärt.

4.3. Vergleich zwischen CXCR4 und CXCR3

Beim Vergleich zwischen CXCR3 und CXCR4 fällt ein sehr unterschiedliches Expressionsverhalten auf. Während CXCR3 nur in geringer Zahl auf nativen, unstimulierten PBMC transkribiert und exprimiert wird, ist CXCR4 auf einem hohen Prozentsatz von PBMC zu finden und wird konstitutiv in hohen Zahlen transkribiert. Nach Stimulation mit Myelinantigenen oder PHA jedoch wird CXCR3 auf T-Zellen deutlich hochreguliert, CXCR4 dagegen wird nach Stimulation mit PHA deutlich herunterreguliert.

4.4. Schlussüberlegungen

Für CXCR3 wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass dieser Rezeptor sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS spielt. Dies wurde auch durch die Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit erzielt wurden, untermauert. Es konnte gezeigt werden, dass CXCR3 durch Stimulation mit Myelinautoantigenen induziert werden kann.

CXCR4 ist in Verbindung mit der MS bisher nicht in Erscheinung getreten, es wurde sogar behauptet, dass CXCR4 keine immunologischen Aufgaben besäße, abgesehen von der Rolle bei der Reifung von Vorläuferzellen verschiedener Zellreihen (Sallusto et al., 1999).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse jedoch und auch schon alleine die Tatsache, dass der Rezeptor von verschiedenen Mediatoren hoch- oder herunterreguliert werden kann, deuten jedoch verstärkt darauf hin, dass dieser Rezeptor eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen spielt, sowohl bei Abwehrreaktionen gegen körperfremde Organismen und Stoffe als auch bei Autoimmunreaktionen.

Die hier vorliegende Arbeit konnte einige Fragen beantwortet aber auch einige neue Fragen aufwerfen, die es in zukünftigen Forschungsarbeiten zu klären gilt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut von Multiple Sklerose (MS)-Patienten und gesunden Probanden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation getrennt und anschließend auf die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 untersucht. Gemessen wurde die Expression vor und nach Stimulation mit Myelin-Oligodendrocyte-Glykoprotein (MOG)-Antigenen. Als Untersuchungsmethoden wurden TaqMan-PCR und FACS angewandt.

CXCR3 wurde durch die Stimulation mit MOG-Antigenen in den TaqMan-PCR Untersuchungen, d. h. auf RNA-Ebene signifikant hochreguliert. In den FACS-Untersuchungen, d. h. auf Rezeptorebene war auch eine Induktion erkennbar, aber deutlich schwächer. Anhand der erzielten Ergebnisse konnte eine Hypothese zu den Pathomechanismen, die eine Einwanderung myelinspezifischer, autoreaktiver T-Zellen ins ZNS bei MS-Patienten bewirken, formuliert werden. CXCR3 spielt dabei eine entscheidende Rolle.

CXCR4 wurde durch die Stimulation mit MOG-Antigenen auf RNA-Ebene deutlich induziert. Auf Rezeptorebene dagegen ist bei den Lymphozyten praktisch kein Effekt feststellbar gewesen. Interessanterweise führte die Stimulation mit dem Mitogen PHA bei beiden Untersuchungsmethoden zu einer signifikanten Herunterregulierung. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können dadurch erklärt werden, dass CXCR4 in den mononukleären Zellen zwar induziert wird, die Rezeptoren jedoch im Zytoplasma verweilen und nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden. Einiges spricht jedoch auch dafür, dass die Stimulation mit MOG-Antigenen nur in der Makrophagen-Population eine Induktion bewirkt, während es in der Lymphozyten-Population zu einer Induktionshemmung kommt.

Die erzielten Ergebnisse deuten nachdrücklich darauf hin, dass nicht nur CXCR3, sondern auch CXCR4 sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS spielen. Diese Arbeit trägt dazu bei, neue Erkenntnisse über die überaus komplexen Effekte und Aufgaben der Chemokin-Rezeptoren und ihrer Liganden bei der MS zu erlangen.

6. TABELLEN

Tabelle 1a **TaqMan-PCR****CXCR3**Absolute Deltadelta CT-Werte

	kein Antigen	MOG91-108	MOG93-108	MOG141-156	MOG146-154	MOG1-125	MOG1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Kontrolle 01	1,56	0,53	1,12	0,93	0,88	0,98	1,51	0,57	0,97	2,91	0,31
Kontrolle 02	0,72	1,02	0,74	0,88	0,92	1,30	1,49	0,74	0,71	8,69	0,24
Kontrolle 03	0,30	0,40	0,77	0,51	0,86	0,68	1,05	0,59	0,70	0,83	0,16
Kontrolle 04	1,00	0,69	0,76	0,79	1,00	1,10	1,02	0,86	0,79	2,05	0,44
Kontrolle 05	0,27	0,55	0,69	0,49	0,76	0,64	0,58	0,44	0,65	1,94	0,14
Kontrolle 06	1,67	1,89	1,97	1,85	2,62	3,36	4,69	1,95	2,31	4,03	0,81
Kontrolle 07	1,41	1,40	1,19	1,31	1,38	4,96	3,06	1,91	2,14	12,00	
Kontrolle 08	2,43	4,07	3,62	3,72	3,42	5,43	5,90	4,18	3,38	6,52	
Kontrolle 09	3,43	3,16	3,18	3,00	3,90	5,00	5,46	5,41	1,39	12,00	0,61
Kontrolle 10	1,01	2,14	0,91	1,60	1,32	2,46	4,26	0,88	1,00	5,39	
Kontrolle 11	1,52	1,48	3,77	1,49	1,65	4,23	5,03	3,75	2,03	4,13	
Kontrolle 12	1,28	1,48	1,10	1,34	1,31	2,84	3,89	2,03	1,74	9,61	0,86
Kontrolle 13	2,81	3,45	1,87	1,92	2,63	6,84	8,43	3,47	3,31	11,51	0,87
Durchschnitt	1,49	1,71	1,67	1,53	1,74	3,06	3,57	2,06	1,62	6,28	0,49

Tabelle 1a. Tabellarische Darstellung aller Werte der TaqMan-PCR Untersuchung von CXCR3 der Kontrollgruppe, die in Abbildung 1a eingegangen sind. Angegeben sind die absoluten $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ –Werte.

Tabelle 1a Fortsetzung

	kein Antigen	MOG91-108	MOG93-108	MOG141-156	MOG146-154	MOG1-125	MOG1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Patient 01	0,62	0,68	0,58	0,77	1,00	1,26	1,53	0,84	0,90	2,45	0,55
Patient 02	1,15	1,46	1,76	1,64	2,32	2,85	2,56	2,11	1,88	9,88	0,56
Patient 03	1,52	1,76	1,21	2,97		2,28	3,32	1,18	1,66	5,15	0,24
Patient 04	3,45	2,98	2,82	2,79	2,38	2,86	4,08	2,36	1,66	5,68	0,90
Patient 05	1,57	1,78	2,69	1,99	1,56	8,25	6,82	3,07	1,97	7,01	
Patient 06	1,38	1,39	0,98	1,61	1,10	2,11	4,79	1,09	0,55	3,12	0,48
Patient 07	1,64	1,02	1,44	1,47	1,02	2,01	2,58	1,89	0,21	1,14	0,19
Patient 08	1,74	1,31	1,21	0,99	1,28	1,62	1,74	1,25	1,03	2,03	0,30
Patient 09	1,08	1,43	0,79	1,02	1,78	4,96	1,81	3,11	0,99	2,69	0,18
Patient 10	0,71	0,90	1,91	1,45	1,38	2,67	2,37	1,31	1,10	5,66	
Patient 11	0,59	0,73	0,62	0,73	0,99	0,98	0,80	0,64	0,86	1,02	0,23
Patient 12	0,60	0,66	0,93	0,70	0,82	1,23	1,60	0,55	0,72	1,65	0,01
Patient 13	2,06		1,62	1,89	2,21	3,42	3,84	2,07	1,53	3,22	
Patient 14	1,87	2,79	1,56	2,23	2,83	4,71	4,17	3,08	2,91	5,88	
Patient 15	3,01	2,98	3,33	2,18	1,96	3,51	3,84	2,45	1,89	8,63	0,69
Patient 16	2,53	2,47	2,74	1,88	3,67	4,17	8,97		1,89		
Patient 17	1,06	1,31	1,40	1,51	1,42	3,38	5,22	1,60	0,42	9,06	0,75
Patient 18	2,14	2,29	1,71	2,31	2,50	2,41	4,77	4,76	1,58	8,11	1,11
Patient 19	1,41	2,31	1,63	2,01	2,27	1,93	4,41	1,97	1,64	5,01	0,72
Patient 20	3,36	2,70	2,06	3,24	2,81	3,54	5,06	3,97	2,23	8,66	0,92
Durchschnitt	1,68	1,73	1,65	1,77	1,86	3,01	3,71	2,07	1,38	5,05	0,52

Tabelle 1a. (Fortsetzung) Tabellarische Darstellung aller Werte der TaqMan-PCR Untersuchung von CXCR3 der Patientengruppe, die in Abbildung 1a eingegangen sind. Angegeben sind die absoluten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte.

Tabelle 1b **TaqMan-PCR****CXCR3 Q**Relative Deltadelta CT-Werte

	MOG 91-108	MOG 93-108	MOG 141-156	MOG 146-154	MOG 1-125	MOG 1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Kontrolle 01	0,34	0,71	0,60	0,56	0,63	0,97	0,37	0,62	1,86	0,20
Kontrolle 02	1,41	1,02	1,22	1,27	1,80	2,07	1,03	0,98	7,00	0,33
Kontrolle 03	1,34	2,60	1,72	2,92	2,30	3,54	1,99	2,36	2,80	0,55
Kontrolle 04	0,69	0,76	0,79	1,00	1,10	1,02	0,86	0,79	2,05	0,44
Kontrolle 05	2,02	2,55	1,82	2,80	2,35	2,14	1,63	2,37	7,11	0,51
Kontrolle 06	1,13	1,18	1,11	1,57	2,01	2,81	1,16	1,38	2,41	0,48
Kontrolle 07	0,99	0,84	0,93	0,97	3,51	2,17	1,35	1,51	7,00	
Kontrolle 08	1,68	1,49	1,53	1,41	2,23	2,43	1,72	1,39	2,69	
Kontrolle 09	0,92	0,93	0,87	1,14	1,46	1,59	1,57	0,40	3,49	0,18
Kontrolle 10	2,12	0,90	1,58	1,31	2,44	4,21	0,87	0,99	5,33	
Kontrolle 11	0,98	2,49	0,98	1,09	2,79	3,32	2,47	1,34	2,72	
Kontrolle 12	1,15	0,86	1,04	1,02	2,21	3,03	1,58	1,35	7,49	0,67
Kontrolle 13	1,23	0,66	0,68	0,94	2,44	3,00	1,24	1,18	4,10	0,31
Durchschnitt	1,23	1,31	1,14	1,38	2,10	2,48	1,37	1,28	4,31	0,41

Tabelle 1b. Tabellarische Darstellung aller Werte der TaqMan-PCR Untersuchung von CXCR3 der Kontrollgruppe, die in Abbildung 1b eingegangen sind. Angegeben sind die relativen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte, das heißt es wurde ein Quotient aus den $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte der einzelnen Antigene und der jeweiligen Negativkontrolle ('kein Antigen'-Kontrolle) gebildet.

Tabelle 1b Fortsetzung

	MOG 91-108	MOG 93-108	MOG 141-156	MOG 146-154	MOG 1-125	MOG 1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Patient 01	1,09	0,93	1,24	1,60	2,03	2,45	1,34	1,45	3,93	0,88
Patient 02	1,27	1,53	1,42	2,01	2,47	2,22	1,83	1,63	8,57	0,49
Patient 03	1,16	0,80	1,96		1,51	2,19	0,78	1,09	3,40	0,16
Patient 04	0,86	0,82	0,81	0,69	1,00	1,19	0,69	0,48	1,65	0,26
Patient 05	1,13	1,71	1,26	0,99	4,50	4,33	1,95	1,25	4,45	
Patient 06	1,01	0,71	1,17	0,80	1,53	3,48	0,80	0,40	2,27	0,35
Patient 07	0,62	0,88	0,90	0,62	1,23	1,57	1,15	0,13	0,69	0,12
Patient 08	0,76	0,69	0,57	0,74	0,93	1,00	0,72	0,59	1,16	0,17
Patient 09	1,32	0,73	0,95	1,65	4,59	1,68	2,88	0,91	2,50	0,17
Patient 10	1,26	2,68	2,03	1,93	3,74	3,32	1,83	1,54	7,92	
Patient 11	1,24	1,05	1,24	1,68	1,67	1,36	1,09	1,47	1,74	0,38
Patient 12	1,11	1,55	1,17	1,37	2,06	2,68	0,92	1,21	2,76	0,02
Patient 13		0,78	0,92	1,07	1,66	1,86	1,00	0,74	1,56	
Patient 14	1,49	0,84	1,19	1,51	2,51	2,23	1,65	1,55	3,14	
Patient 15	0,99	1,11	0,72	0,65	1,16	1,27	0,82	0,63	2,87	0,23
Patient 16	0,98	1,08	0,74	1,45	1,65	3,54		0,74		
Patient 17	1,24	1,32	1,41	1,34	3,17	4,91	1,50	0,39	8,51	0,70
Patient 18	1,07	0,80	1,08	1,16	1,13	2,23	2,22	0,74	3,78	0,52
Patient 19	1,64	1,16	1,42	1,61	1,37	3,13	1,40	1,16	3,55	0,51
Patient 20	0,80	0,61	0,96	0,84	1,05	1,51	1,18	0,66	2,57	0,27
Durchschnitt	1,11	1,09	1,16	1,25	2,05	2,41	1,35	0,94	3,53	0,35

Tabelle 1b. (Fortsetzung) Tabellarische Darstellung aller Werte der TaqMan PCR Untersuchung von CXCR3 der Patientengruppe, die in Abbildung 1b eingegangen sind. Angegeben sind die relativen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ –Werte.

Tabelle 2 **TaqMan-PCR****CXCR3 Q nach Krankheitsverlauf**Relative Deltadelta CT-Werte**Krankheitsverlauf: schubförmig**

	MOG 91-108	MOG 93-108	MOG 141-156	MOG 146-154	MOG 1-125	MOG 1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Patient 01	0,86	0,82	0,81	0,69	1,00	1,19	0,69	0,48	1,65	0,26
Patient 02	1,13	1,71	1,26	0,99	4,50	4,33	1,95	1,25	4,45	
Patient 03	0,62	0,88	0,90	0,62	1,23	1,57	1,15	0,13	0,69	0,12
Patient 04	0,76	0,69	0,57	0,74	0,93	1,00	0,72	0,59	1,16	0,17
Patient 05	1,32	0,73	0,95	1,65	4,59	1,68	2,88	0,91	2,50	0,17
Patient 06	1,26	2,68	2,03	1,93	3,74	3,32	1,83	1,54	7,92	
Patient 07	1,11	1,55	1,17	1,37	2,06	2,68	0,92	1,21	2,76	0,02
Patient 08		0,78	0,92	1,07	1,66	1,86	1,00	0,74	1,56	
Patient 09	1,49	0,84	1,19	1,51	2,51	2,23	1,65	1,55	3,14	
Patient 10	0,98	1,08	0,74	1,45	1,65	3,54		0,74		
Patient 11	1,24	1,32	1,41	1,34	3,17	4,91	1,50	0,39	8,51	0,70
Patient 12	1,64	1,16	1,42	1,61	1,37	3,13	1,40	1,16	3,55	0,51
Patient 13	0,80	0,61	0,96	0,84	1,05	1,51	1,18	0,66	2,57	0,27
Durchschnitt	1,10	1,14	1,10	1,22	2,27	2,53	1,41	0,88	3,37	0,42

Krankheitsverlauf: chronisch-progredient

	MOG 91-108	MOG 93-108	MOG 141-156	MOG 146-154	MOG 1-125	MOG 1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Patient 01	1,09	0,93	1,24	1,60	2,03	2,45	1,34	1,45	3,93	0,88
Patient 02	1,27	1,53	1,42	2,01	2,47	2,22	1,83	1,63	8,57	0,49
Patient 03	1,01	0,71	1,17	0,80	1,53	3,48	0,80	0,40	2,27	0,35
Patient 04	1,24	1,05	1,24	1,68	1,67	1,36	1,09	1,47	1,74	0,38
Patient 05	0,99	1,11	0,72	0,65	1,16	1,27	0,82	0,63	2,87	0,23
Patient 06	1,07	0,80	1,08	1,16	1,13	2,23	2,22	0,74	3,78	0,52
Durchschnitt	1,11	1,02	1,15	1,32	1,67	2,17	1,35	1,05	3,86	0,47

FACS CXCR3

Tabelle 3

Relative Geometrische Mittelwerte

	MOG91-108	MOG141-156	MOG1-125	MOG1-218	Influ. A	MBP	PHA
Patient 01	1,00	1,06	1,21	1,30	1,17	1,08	1,50
Patient 02	0,98	1,00	1,43	1,21	1,09	1,00	1,33
Patient 03	1,06	1,03	1,59	1,35	1,26	1,04	1,63
Patient 04	1,15	1,08	1,37	0,93	1,27	1,10	1,27
Patient 05	1,02	1,15	1,15	1,09	1,16	1,03	1,24
Patient 06	1,01	1,08	1,36	1,08	1,04	1,00	2,17
Durchschnitt	1,04	1,07	1,35	1,16	1,16	1,04	1,52
Kontrolle 01	1,06	1,05	1,09	1,05	1,00	0,96	1,12
Kontrolle 02	1,09	1,26	1,22	1,18	1,18	1,11	1,15
Kontrolle 03	1,04	0,94	1,10	1,07	1,04	1,11	1,45
Kontrolle 04	1,05	1,00	1,01	1,06	1,09	1,01	1,27
Kontrolle 05	1,05	0,98	1,31	1,19	1,06	1,06	1,53
Kontrolle 06	1,02	0,99	1,09	1,14	1,07	1,10	1,67
Durchschnitt	1,05	1,04	1,14	1,12	1,07	1,06	1,36

Prozentsatz der Zellen, die innerhalb der Marker- Grenzen lagen

	MOG91-108	MOG141-156	MOG1-125	MOG1-218	Influ. A	MBP	PHA	keinAntigen
Patient 01	26,12	43,58	42,72	44,92	51,83	32,23	55,95	25,39
Patient 02	23,93	24,54	39,76	32,33	30,36	24,37	54,46	25,90
Patient 03	32,19	34,46	46,42	40,70	40,12	31,73	29,23	37,06
Patient 04	42,19	42,97	49,77	41,04	45,03	41,41	67,23	36,11
Patient 05	17,02	25,56	24,92	21,70	33,55	19,12	31,11	18,27
Patient 06	16,48	21,93	27,90	21,52	21,13	18,14	74,51	17,55
Durchschnitt	26,32	32,17	38,58	33,70	37,00	27,83	52,08	26,71
Kontrolle 01	15,12	17,18	24,34	17,29	14,07	13,06	29,93	15,21
Kontrolle 02	31,08	40,46	40,17	39,79	32,17	44,22	31,98	28,01
Kontrolle 03	39,48	34,33	44,08	41,51	38,92	40,98	68,65	39,74
Kontrolle 04	21,27	22,23	29,08	26,91	24,46	21,05	47,56	19,77
Kontrolle 05	29,18	27,76	40,94	35,13	35,10	28,45	47,03	27,23
Kontrolle 06	21,11	19,75	34,22	31,57	25,65	22,95	48,61	18,25
Durchschnitt	26,21	26,95	35,47	32,03	28,40	28,45	45,63	24,70

Tabelle 4a **TaqMan-PCR****CXCR4**Absolute Deltadelta CT-Werte

	kein Antigen	MOG91-108	MOG93-108	MOG141-156	MOG146-154	MOG1-125	MOG1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Kontrolle 01	2,46	1,34	3,61	2,37	2,39	1,22	2,23	2,66	2,56	1,07	1,02
Kontrolle 02	0,75	1,23	0,80	0,74	2,71	0,94	1,74	0,84	1,11	1,30	0,80
Kontrolle 03	1,52	1,51	2,13	1,49	2,01	2,17	1,93	1,94	1,80	0,81	1,75
Kontrolle 04	1,00	0,91	0,63	0,93	1,28	1,19	1,13	0,51	0,76	0,62	1,19
Kontrolle 05	0,75	1,18	1,56	0,88	1,54	1,40	1,00	1,20	0,97	1,05	1,30
Kontrolle 06	3,00	3,90	4,10	3,18	5,41	8,60	6,94	4,14	3,47	4,27	2,87
Kontrolle 07	2,90	2,91	2,45	2,01	2,98	8,00	5,17	3,39	3,10	2,56	
Kontrolle 08	3,78	6,59	5,24	4,56	6,80	7,41	7,84	4,66	4,30	1,78	2,43
Kontrolle 09	7,16	7,16	7,14	6,13	7,00		6,80	6,73	4,17	2,82	3,89
Kontrolle 10	2,60	2,06	1,61	2,09	2,20	2,56	5,10	1,91	4,56	1,04	
Kontrolle 11	3,30	3,29	4,61	3,32	4,11	5,31	8,94	4,96	2,64	1,97	
Kontrolle 12	2,52	3,06	2,63	2,39	4,33	4,71	4,26	2,87	3,12	1,77	2,08
Kontrolle 13	2,68	3,42	3,03	2,75	4,35	5,64	5,26	4,10	3,69	0,89	3,85
Durchschnitt	2,88	2,97	3,04	2,53	3,62	4,10	4,49	3,07	2,79	1,69	2,12

Tabelle 4a. Tabellarische Darstellung aller Werte der TaqMan-PCR Untersuchung von CXCR4 der Kontrollgruppe, die in Abbildung 4a eingegangen sind. Angegeben sind die absoluten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ –Werte.

Tabelle 4a Fortsetzung

	kein Antigen	MOG91-108	MOG93-108	MOG141-156	MOG146-154	MOG1-125	MOG1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Patient 01	1,19	0,98	1,01	0,66	1,21	1,50	1,28	1,32	0,97	0,53	0,53
Patient 02	0,80	1,12	1,11	1,41	1,78	2,06	2,51	2,26	2,15	3,00	1,19
Patient 03	3,23	4,11	4,14	2,11	1,82	4,53	8,94	3,43	4,38	4,47	1,04
Patient 04	6,89	5,88	5,92	4,24	5,39	5,22	8,11	6,17	3,31	2,54	5,12
Patient 05	1,93	2,58	2,53	1,77	1,58	4,71	6,48	5,66	3,31	2,69	
Patient 06	5,10	4,42	2,96	3,59	2,28	6,99	5,48	3,10	1,74	1,38	1,62
Patient 07	2,51	2,69	2,86	1,95	1,89	3,53	2,80	2,90	1,87	2,23	2,04
Patient 08	2,35	2,50	2,22	1,75	2,78	3,03	2,33	1,87	1,64	1,19	1,78
Patient 09	2,71	2,36	1,50	1,72	3,33	4,21	4,00	2,78	2,75	1,54	2,23
Patient 10	1,31	1,67	2,48	0,75	1,58	1,16	2,60	2,07	1,53	2,14	1,49
Patient 11	1,03	1,38	0,81	1,49	1,90	1,70	0,83	1,02	0,69	1,41	1,12
Patient 12	1,02	1,06	1,40	1,04	1,52	1,91	2,11	1,05	1,27	0,84	1,71
Patient 13	2,53		1,45	1,45	1,75	3,24	2,77	1,64	1,59	0,99	
Patient 14	2,85	2,96	2,69	3,29	5,74	4,18	4,99	4,17	2,80	0,83	
Patient 15	1,69	2,25	3,39	2,99	4,99	4,01	4,47	3,43	2,28	0,85	1,89
Patient 16	3,53	3,61	3,46	3,61	5,31	5,84	3,53	2,61	3,06	3,53	3,17
Patient 17	2,78	3,36	1,93	1,85	4,10	4,55	3,45	2,29	3,71	0,52	2,58
Patient 18	2,39	3,32	2,26	2,41	4,96	3,51	5,86	3,75	2,72	1,07	2,24
Patient 19	2,47	5,31	4,08	4,94	4,52	4,91	7,16	5,62	4,29	2,72	2,74
Patient 20	3,14	2,72	2,21	3,33	5,56	4,99	5,56	2,54	2,39	1,72	1,29
Durchschnitt	2,57	2,86	2,52	2,32	3,20	3,79	4,26	2,98	2,42	1,81	1,99

Tabelle 4a. (Fortsetzung) Tabellarische Darstellung aller Werte der TaqMan-PCR Untersuchung von CXCR4 der Patientengruppe, die in Abbildung 4a eingegangen sind. Angegeben sind die absoluten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ –Werte.

Tabelle 4b **TaqMan-PCR****CXCR4 Q**Relative Deltadelta CT-Werte

	MOG 91-108	MOG 93-108	MOG 141-156	MOG 146-154	MOG 1-125	MOG 1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Kontrolle 01	0,54	1,46	0,96	0,97	0,49	0,91	1,08	1,04	0,44	0,42
Kontrolle 02	1,64	1,07	0,99	2,00	1,25	2,31	1,13	1,48	0,80	2,15
Kontrolle 03	0,99	1,40	0,98	1,32	1,43	1,27	1,27	1,18	0,53	1,15
Kontrolle 04	0,91	0,63	0,93	1,28	1,19	1,13	0,51	0,76	0,62	1,19
Kontrolle 05	1,58	1,50	1,18	2,06	1,88	1,33	1,60	1,29	1,40	1,74
Kontrolle 06	0,65	0,68	0,53	0,90	1,42	1,15	0,69	0,57	0,71	0,48
Kontrolle 07	1,00	0,85	0,69	1,03	2,00	1,78	1,17	1,07	0,88	
Kontrolle 08	1,74	1,39	1,21	1,80	1,96	2,07	1,23	1,14	0,47	0,64
Kontrolle 09	1,00	1,00	0,86	0,98		0,95	0,94	0,58	0,39	0,54
Kontrolle 10	0,79	0,62	0,80	0,85	0,98	1,96	0,73	1,75	0,40	
Kontrolle 11	1,00	1,40	1,01	1,25	1,61	2,71	1,50	0,80	0,60	
Kontrolle 12	1,21	1,04	0,95	1,72	1,87	1,69	1,14	1,24	0,70	0,82
Kontrolle 13	1,28	1,13	1,03	1,62	2,11	1,97	1,53	1,38	0,33	1,44
Durchschnitt	1,15	1,14	0,97	1,44	1,64	1,72	1,17	1,14	0,69	1,00

Tabelle 4b. Tabellarische Darstellung aller Werte der TaqMan-PCR Untersuchung von CXCR4 der Kontrollgruppe, die in Abbildung 4b eingegangen sind. Angegeben sind die relativen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte, das heißt es wurde ein Quotient aus den $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werten der einzelnen Antigene und der jeweiligen Negativkontrolle ('kein Antigen'-Kontrolle) gebildet.

Tabelle 4b Fortsetzung		MOG 91-108	MOG 93-108	MOG 141-156	MOG 146-154	MOG 1-125	MOG 1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Patient 01		0,82	0,85	0,55	1,02	1,26	1,08	1,11	0,82	0,45	0,45
Patient 02		1,40	1,39	1,76	2,00	2,58	3,14	2,00	2,69		1,49
Patient 03		1,27	1,28	0,66	0,56	1,40	2,77	1,06	1,36	1,39	0,32
Patient 04		0,85	0,86	0,62	0,78	0,76	1,18	0,90	0,48	0,37	0,74
Patient 05		1,34	1,31	0,92	0,82	2,44	3,36	2,00	1,72	1,39	
Patient 06		0,87	0,58	0,70	0,45	1,37	1,08	0,61	0,34	0,27	0,32
Patient 07		1,07	1,14	0,78	0,75	1,41	1,12	1,16	0,75	0,89	0,82
Patient 08		1,06	0,94	0,74	1,18	1,29	0,99	0,79	0,69	0,50	0,76
Patient 09		0,87	0,55	0,64	1,23	1,55	1,47	1,02	1,01	0,57	0,82
Patient 10		1,27	1,89	0,57	1,21	0,89	1,99	1,58	1,16	1,64	1,14
Patient 11		1,34	0,78	1,45	1,85	1,65	0,80	0,99	0,68	1,37	1,09
Patient 12		1,04	1,37	1,02	1,48	1,87	2,06	1,02	1,24	0,82	1,66
Patient 13			0,57	0,57	0,69	1,28	1,09	0,65	0,63	0,39	
Patient 14		1,04	0,94	1,16	2,01	1,47	1,75	1,46	0,98	0,29	
Patient 15		1,33	2,00	1,77	2,00	2,37	2,64	2,03	1,35	0,50	1,11
Patient 16		1,02	0,98	1,02	1,51	1,65	1,00	0,74	0,87	1,00	0,90
Patient 17		1,21	0,69	0,66	1,47	1,64	1,24	0,82	1,33	0,19	0,93
Patient 18		1,39	0,94	1,01	2,07	1,46	2,45	1,56	1,14	0,45	0,94
Patient 19		2,15	1,65	2,00	1,83	1,99	2,90	2,27	1,74	1,10	1,11
Patient 20		0,87	0,70	1,06	1,77	1,59	1,77	0,81	0,76	0,55	0,41
Durchschnitt		1,17	1,07	0,98	1,33	1,60	1,79	1,23	1,09	0,74	0,88

Tabelle 4b. (Fortsetzung) Tabellarische Darstellung aller Werte der TaqMan-PCR Untersuchung von CXCR4 der Patientengruppe, die in Abbildung 4b eingegangen sind. Angegeben sind die relativen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ –Werte.

Tabelle 5 **TaqMan-PCR****CXCR4 Q nach Krankheitsverlauf**Relative Deltadelta CT-Werte**Krankheitsverlauf: schubförmig**

	MOG 91-108	MOG 93-108	MOG 141-156	MOG 146-154	MOG 1-125	MOG 1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Patient 01	0,85	0,86	0,62	0,78	0,76	1,18	0,90	0,48	0,37	0,74
Patient 02	1,34	1,31	0,92	0,82	2,44	3,36	2,00	1,72	1,39	
Patient 03	1,07	1,14	0,78	0,75	1,41	1,12	1,16	0,75	0,89	0,82
Patient 04	1,06	0,94	0,74	1,18	1,29	0,99	0,79	0,69	0,50	0,76
Patient 05	0,87	0,55	0,64	1,23	1,55	1,47	1,02	1,01	0,57	0,82
Patient 06	1,27	1,89	0,57	1,21	0,89	1,99	1,58	1,16	1,64	1,14
Patient 07	1,04	1,37	1,02	1,48	1,87	2,06	1,02	1,24	0,82	1,66
Patient 08		0,57	0,57	0,69	1,28	1,09	0,65	0,63	0,39	
Patient 09	1,04	0,94	1,16	2,01	1,47	1,75	1,46	0,98	0,29	
Patient 10	1,02	0,98	1,02	1,51	1,65	1,00	0,74	0,87	1,00	0,90
Patient 11	1,21	0,69	0,66	1,47	1,64	1,24	0,82	1,33	0,19	0,93
Patient 12	2,15	1,65	2,00	1,83	1,99	2,90	2,27	1,74	1,10	1,11
Patient 13	0,87	0,70	1,06	1,77	1,59	1,77	0,81	0,76	0,55	0,41
Durchschnitt	1,15	1,05	0,90	1,29	1,52	1,69	1,17	1,03	0,75	0,93

Krankheitsverlauf: chronisch-progredient

	MOG 91-108	MOG 93-108	MOG 141-156	MOG 146-154	MOG 1-125	MOG 1-218	Influ. A	MBP	PHA	Native PBMC
Patient 01	0,82	0,85	0,55	1,02	1,26	1,08	1,11	0,82	0,45	0,45
Patient 02	1,40	1,39	1,76	2,00	2,58	3,14	2,00	2,69		1,49
Patient 03	0,87	0,58	0,70	0,45	1,37	1,08	0,61	0,34	0,27	0,32
Patient 04	1,34	0,78	1,45	1,85	1,65	0,80	0,99	0,68	1,37	1,09
Patient 05	1,33	2,00	1,77	2,00	2,37	2,64	2,03	1,35	0,50	1,11
Patient 06	1,39	0,94	1,01	2,07	1,46	2,45	1,56	1,14	0,45	0,94
Durchschnitt	1,19	1,09	1,21	1,56	1,78	1,86	1,38	1,17	0,61	0,90

FACS CXCR4

Tabelle 6

Relative Geometrische Mittelwerte

	MOG91-108	MOG141-156	MOG1-125	MOG1-218	Influ. A	MBP	PHA
Patient 01	1,00	1,00	0,92	1,05	0,87	0,99	0,78
Patient 02	0,90	0,85	0,99	1,03	1,02	0,93	0,79
Patient 03	1,11	1,02	1,21	1,23	0,95	1,13	0,79
Patient 04	1,23	1,24		1,22	1,19	1,31	0,56
Patient 05	1,03	1,11	0,98	0,85	1,17	1,11	0,69
Patient 06	0,97	0,97	0,99	0,99	0,86	0,97	0,64
Durchschnitt	1,04	1,03	1,02	1,06	1,01	1,07	0,71
Kontrolle 01	1,00	0,90	0,92	0,68	0,81	0,96	0,68
Kontrolle 02	0,94	0,86	1,02	0,89	0,93		0,83
Kontrolle 03	1,07	0,84	0,95	0,87	0,90	1,01	0,42
Kontrolle 04	1,05	0,90	0,86	0,71	0,90	0,99	0,54
Durchschnitt	1,02	0,87	0,94	0,79	0,88	0,99	0,62

Prozentsatz der Zellen, die innerhalb der Marker- Grenzen lagen

	MOG91-108	MOG141-156	MOG1-125	MOG1-218	Influ. A	MBP	PHA	keinAntigen
Patient 01	53,97	53,97	50,62	54,17	59,15	51,16	48,39	54,51
Patient 02	63,21	67,12	83,69	83,95	73,73	65,97	68,83	70,40
Patient 03	76,82	73,95	85,83	83,28	70,29	80,39	39,76	69,24
Patient 04	70,43	67,86		73,40	70,58	72,41	46,64	90,36
Patient 05	46,95	45,05	57,94	46,98	53,30	47,53	35,57	40,17
Patient 06	60,80	59,58	75,67	77,97	63,04	61,44	23,21	66,40
Durchschnitt	62,03	61,26	72,19	69,96	65,02	63,15	43,73	65,18
Kontrolle 01	64,34	63,66	72,24	57,89	57,69	63,48	55,61	84,51
Kontrolle 02	81,70	73,58	90,22	86,87	81,88		75,50	82,39
Kontrolle 03	89,92	84,96	92,56	91,56	88,79	89,58	48,45	88,79
Kontrolle 04	82,98	81,68	87,46	80,23	83,19	81,97	49,86	82,40
Durchschnitt	79,74	75,97	85,62	79,14	77,89	74,72	57,36	84,52

Tabelle 7

Autor (et al.) Jahr d. Publikation	Sorensen 1999	Sorensen 2002	Martinez-C. 2002	Misu 2001	Eikelenboom 2002
MS-Patientenzahl	7	21	68	21RR (Schub-Rem)	124 (39RR/40SP/45PP)
CD4+ Zellen im Blut	38	32	13	27/29	23 (22/22/26)
CD8+ Zellen im Blut	80	67	15	57/52	46* (49/50/42)
CD4+ Zellen im Liquor	79	82	n.u.	74	n.u.
CD8+ Zellen im Liquor	97	92	n.u.	87	n.u.
Kontrollenzahl	6	24	26	12	22
CD4+ Zellen im Blut	47	31	12	22	21
CD8+ Zellen im Blut	84	66	16	45	30
CD4+ Zellen im Liquor	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
CD8+ Zellen im Liquor	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

Autor (et al.) Jahr d. Publikation	Teleshova 2002	Kivisäkk 2002	Sindern 2002	Balashov 1999
MS-Patientenzahl	41	5	22RR	34 (14RR/20SP)
T-Zellen ges. Blut	7*	44	77	14*/15*
T-Zellen ges. Liquor	55	91	94	n.u.
Kontrollenzahl	22	11	22	20
T-Zellen ges. Blut	3	51	84	9
T-Zellen ges. Liquor	n.u.	92	n.u.	n.u.

Tabelle 7. Zusammenstellung der Ergebnisse anderer Autoren bezüglich der CXCR3-Expression auf T-Zellen bei Patienten vs. Kontrollen.

Die Daten zu den T-Zellen sind jeweils Prozentangaben.

(RR = schubförmig, SP = sekundär chronisch-progredient, PP = primär chronisch-progredient; Schub = Patienten im Schub, Rem = Patienten in der Remission; * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe)

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abo, S., Bernard, C. C., Webb, M., Johns, T. G., Alafaci, A., Ward, L. D., Simpson, R. J., and Kerlero de Rosbo, N.** (1993). Preparation of highly purified human myelin oligodendrocyte glycoprotein in quantities sufficient for encephalitogenicity and immunogenicity studies. *Biochem Mol Biol Int* 30, 945-58.
2. **Adelmann, M., Wood, J., Benzel, I., Fiori, P., Lassmann, H., Matthieu, J. M., Gardinier, M. V., Dornmair, K., and Linington, C.** (1995). The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 63, 17-27.
3. **Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T., and Gutierrez-Ramos, J. C.** (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ haematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 185, 111-120.
4. **Amor, S., Groome, N., Linington, C., Morris, M. M., Dornmair, K., Gardinier, M. V., Matthieu, J. M., and Baker, D.** (1994). Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol* 153, 4349-56.
5. **Amsen, D., and Kruisbeek, A. M.** (1998). Thymocyte selection: not by TCR alone. *Immunol Rev* 165, 209-29.
6. **Annunziato, F., Galli, G., Cosmi, L., Romagnani, P., Manetti, R., Maggi, E., and Romagnani, S.** (1998). Molecules associated with human Th1 or Th2. *Eur Cytokine Netw* 9(suppl), 12-6.
7. **Arimilli, S., Ferlin, W., Salvason, N., Deshpande, S., Howard, M., and Mocci, S.** (2000). Chemokines in autoimmune diseases. *Immunol Rev* 177, 43-51.
8. **Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B.** (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55, 97-179.

9. **Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B.** (1997). Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15, 675-705.
10. **Baggiolini, M.** (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-8.
11. **Balashov, K. E., Smith, D. R., Khoury, S. J., Hafler, D. A., and Weiner, H. L.** (1997). Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 599-603.
12. **Balashov, K. E., Rottman, J. B., Weiner, H. L., and Hancock, W. W.** (1999). CCR5+ and CXCR3+ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6873-8.
13. **Barker, C. F., and Billingham, R. E.** (1977). Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 25, 1-54.
14. **Ben-Nun, A., Wekerle, H., and Cohen, I. R.** (1981). The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 11, 195-9.
15. **Bermejo, M., Martin-Serrano, J., Oberlin, E., Pedraza, M. A., Serrano, A., Santiago, B., Caruz, A., Loetscher, P., Baggiolini, M., Arenzana-Seisdedos, F., and Alcami, J.** (1998). Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains. *Eur J Immunol* 28, 3192-3204.
16. **Birling, M. C., Roussel, G., Nussbaum, F., and Nussbaum, J. L.** (1993). Biochemical and immunohistochemical studies with specific polyclonal antibodies directed against bovine myelin-oligodendocyte glycoprotein. *Neurochem Res* 18, 937-45.
17. **Blackman, M. A., Marrack, P., and Kappler, J.** (1989). Influence of the major histocompatibility complex on positive thymic selection of V beta 17a+ T cells. *Science* 244, 214-7.
18. **Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casanovas, J. M., Aiuti, A., and Springer, T. A.** (1996a). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal-cell derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184, 1101-9.

19. **Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer T. A.** (1996b). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry.
Nature 382, 829-33.
20. **Bleul, C. C., Wu, L. J., Hoxie, J. A., Springer, T. A., and Mackay, C. R.** (1997). The HIV-coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes.
Proc Natl Acad Sci USA 94, 1925-30.
21. **Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A., and Sinigaglia F.** (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s.
J Exp Med 187, 129-34.
22. **Bongioanni, P., Fioretti, C., Vanacore, R., Bianchi, F., Lombardo, F., Ambrogio, G., and Meucci, G.** (1996). Lymphocyte subsets in multiple sclerosis. A study with two-colour fluorescence analysis.
J Neurol Sci 139, 71-7.
23. **Booss, J., Esiri, M. M., Tourtelotte, W. W., and Mason, D. Y.** (1983). Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis.
J Neurol Sci 62, 219-32.
24. **Brosnan, C. F., Cannella, B., Battistini, L., Raine, C. S.** (1995). Cytokine localisation in multiple sclerosis lesions: Correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species.
Neurology 45 (suppl 6), S16-21.
25. **Bruck, W., Porada, P., Poser, S., Rieckmann, P., Hanefeld, F., Kretschmar, H. A., and Lassmann, H.** (1995). Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions.
Ann Neurol 38, 788-96.
26. **Burger, D., and Dayer, J. M.** (1995). Inhibitory cytokines and cytokine inhibitors.
Neurology 45 (suppl 6), S39-43.
27. **Burns, J., Rosenzweig, A., Zweiman, B., and Lisak, R. P.** (1983). Isolation of myelin basic protein-reactive T cell lines from normal human blood.
Cell Immunol 81, 435-40.

28. **Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., and Butcher, E. C.** (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279, 381-4.
29. **Carcot, J. M.** (1893). On arthropathies of cerebral or spinal origin [classical article]. *Clin Orthop*, 4-7.
30. **Carroll, R.G., Riley, J. L., Levine, B. L., Feng, Y., Kaushal, S., Ritchey, D. W., Bernstein, W., Weislow, O. S., Brown, C. R., Berger, E. A., June, C. H., St Louis, D. C.** (1997). Differential regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 costimulation of CD4+ T cells. *Science* 276, 273-6.
31. **Clark-Lewis, I., Kim, K. S., Rajarathnam, K., Gong, J. H., Dewald, B., Moser, B., Baggiolini, M., and Sykes, B. D.** (1995). Structure – activity relationships of chemokines. *J Leukocyte Biol* 57, 703-11.
32. **Cocchi, F., DeVito, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C., and Lusso, P.** (1995). Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270, 1811-15.
33. **Compston, A., and Sadovnick** (1992). Epidemiology and genetics of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 5, 175-81.
34. **Crucian, B., Dunne, P., Friedman, H., Ragsdale, R., Pross, S., and Widen, R.** (1996). Detection of altered T helper 1 and T helper 2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis utilizing intracellular cytokine detection by flow cytometry and surface marker analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 3, 411-6.
35. **Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Baggiolini, M., Sykes, B. D., Clark-Lewis, I.** (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1 ; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 16, 6996-7007.
36. **D'Apuzzo, M., Rolink, A., Loetscher, M., Hoxie, J. A., Clark-Lewis, I., Melchers, F., Baggiolini, M., Moser, B.** (1997). The chemokine SDF-1, stromal-cell derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur J Immunol* 27, 1788-93.

37. **Diaz-Villoslada, P., Shih, A., Shao, L., Genain, C. P., and Hauser, S. L.** (1999). Autoreactivity to myelin antigens: myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a prevalent autoantigen. *J Neuroimmunol* 99, 36-43.
38. **Ebers, G. C., Bulman, D. E., Sadovnick, A. D., Paty, D. W., Warren, S., Hader, W., Murray, T. J., Seland, T., P., Duequette, P., Grey, T., Nelson, R., and Brunet, D.** (1986). A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med* 315, 275-9.
39. **Ebers, G. C., Kukay, K., Bulman, D. E., Sadovnick, A. D., Rice, G., Anderson, C., Armstrong, H., Cousin, C., Bell, R. B., Hader, W., Paty, D. W., Hashimoto, S., Oger, J., Duquette, P., Warren, S., Gray, T., O'Connor, P., Nath, A., Auty, A., Metz, L., Francis, G., Paulseth, J. E., Murray, T. J., Pryse-Phillips, W., Nelson, R., Freedman, M., Brunet, D., Bouchard, J. P., Hinds, D., and Risch, N.** (1996). A full genome screen in multiple sclerosis. *Nature Genet* 13, 472-6.
40. **Eikelenboom, M. J., Killestein, J., Izeboud, T., Kalkers, N. F., van Lier, R. A., Barkhof, F., Uitdehaag, B. M., and Polman, C. H.** (2002). Chemokine receptor expression on T cells is related to new lesion development in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 133, 255-32.
41. **Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A.** (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-7.
42. **Ferguson, B., Matyszak, M. K., Esiri, M. M., and Perry, V. H.** (1997). Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120, 393-9.
43. **Ferrante, P., Fusi, M. L., Saresella, M., Caputo, D., Biasin, M., Trabattoni, D., Salvaggio, A., Clerici, E., de Vries, J. E., Aversa, G., Cazzullo, C. L., and Clerici, M.** (1998). Cytokine production and surface marker expression in acute and stable multiple sclerosis: altered IL-12 production and augmented signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-expressing lymphocytes in acute multiple sclerosis. *J Immunol* 160, 1514-21.
44. **Fife, B. T., Huffnagle, G. B., Kuziel, W. A., and Karpus, W. J.** (2000). CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 192, 899-906.

45. **Fife, B. T., Kennedy, K. J., Paniagua, M. C., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., Luster, A. D., and Karpus, W. J.** (2001). CXCL10 (IFN-gamma-inducible-protein-10) control of encephalitogenic CD4+ T cell accumulation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 166, 7617-24.
46. **Förster, R., Kremmer, E., Schubel, A., Breitfeld, D., Kleinschmidt, A., Nerl, C., Bernhardt, G., and Lipp, M.** (1998). Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/Fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J Immunol* 160, 1522-31
47. **Forsthuber, T. G., Shive, C. L., Wienhold, W., de Graaf, K., Spack, E. G., Sublett, R., Melms, A., Kort, J., Racke, M. K., and Weissert, R.** (2001). T cell epitopes of human myelin oligodendrocyte glycoprotein identified in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice are encephalitogenic and are presented by human B cells. *J Immunol* 167, 7119-25.
48. **Franciotta, D., Martino, G., Zardin, E., Furlan, R., Bergamaschi R., Andreoni, L., and Cosi, V.** (2001). Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. *J Neuroimmunol* 115, 192-8.
49. **Fujinami, R. S., and Oldstone, M. B. A.** (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: a mechanism for autoimmunity. *Science* 230, 1043-5.
50. **Furie, M. B., and Randolph, G. J.** (1995). Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol* 146, 1287-1301.
51. **Gardinier, M. V., Amiguet, P., Linington, C., and Mathieu, J. M.** (1992). Myelin-Oligodendrocyte-Glycoprotein is a unique member of the immunoglobuline superfamily. *J Neurosci Res* 33, 177-87.
52. **Gazitt, Y.** (2000). Immunologic profiles of effector cells and peripheral blood stem cells mobilized with different hematopoietic growth factors. *Stem Cells* 18, 390-8.
53. **Gong, J-H., and Clark-Lewis, I.** (1995). Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH2-terminal residues. *J Exp Med* 181, 631-40.

54. **Guerder, S., Meyerhoff, J., and Flavell, R.** (1994). The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen. *Immunity* 1, 155-66.
55. **Gupta, S. K., Lysko, P. G., Pillarisetti, K., Ohlstein, E., and Stadel, J. M.** (1998). Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 273, 4282-7.
56. **Haines, J. L., Terwedow, H. A., Burgess, K., Pericak-Vance, M. A., Rimmler, J. B., Martin, E. R., Oksenberg, J. R., Lincoln, R., Zhang, D. Y., Banatao, D. R., Gatto, N., Goodkin, D. E., and Hauser, S. L.** (1998). Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet* 7, 1229-34.
57. **Hartung, H. P., Archelos, J.J., Zielasek, J., Gold, R., Koltzenburg, M., Reiners, K. H., and Toyka, K. V.** (1995). Circulating adhesion molecules and inflammatory mediators in demyelination: A review. *Neurology* 45 (suppl 6), S22-32.
58. **He, J. L., Chen, Y. Z., Farzan, M., Choe, H. Y., Ohagen, A., Gartner, S., Busciglio, J., Yang, X., Hofmann, W., Newman, W., Mackay, C. R., Sodroski, J., and Gabuzda, D.** (1997). CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 385, 645-9.
59. **Hesselgesser, J., Halks-Miller, M., DeVecchio, V., Peiper, S. C., Hoxie, J., Kolson, D. L., Taub, D., and Horuk, R.** (1997). CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: Functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol* 7, 112-21.
60. **Hohlfeld, R., E., Meinl, E., Weber, F., Zipp, F., Schmidt, S., Sotgiu, S., Goebels, N., Voltz, R., Spuler, S., Iglesias, A., and Wekerle, H.** (1995). The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurology* 45 (suppl 6), S33-38.
61. **Horuk, R.** (2001). Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 313-5.
62. **Horuk, R., Chitnis, C. E., Darbonne, W. C., Colby, T. J., Rybicki, A., Hadley, T. J., and Miller, L. H.** (1993). A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: The erythrocyte chemokine receptor. *Science* 261, 1182-4.

63. **Iglesias, A., Bauer, J., Litzemberger, T., Schubart, A., and Linington, C.** (2001). T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis.
Glia 36, 220-34.
64. **Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S.** (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance.
J Immunol 162, 5317-26.
65. **Izikson, L., Klein, R. S., Charo, I. F., Weiner, H. L., and Luster, A. D.** (2000). Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2.
J Exp Med 192, 1075-80.
66. **Jahnke, U., Fischer, E. H., and Alvord, E. C. J.** (1985). Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis.
Science 229, 282-284.
67. **Jameson, S. C., Hogquist, K. A., and Bevan, M. J.** (1995). Positive selection of thymocytes.
Annu Rev Immunol 13, 93-126.
68. **Janeway, C. A.,** (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self.
Immunol Today 13, 11-6.
69. **Jazin, E. E., Soderstrom, S., Ebendal, T., and Larhammar, D.** (1997). Embryonic expression of the mRNA for the rat homologue of the fusin/CXCR-4 HIV-1 co-receptor.
J Neuroimmunol 79, 148-54.
70. **Jiang, Y., Salafranca, M. N., Adhikari, S., Xia, Y., Feng, L., Sonntag, M. K., deFiebre, C. M., Pennell, N. A., Streit, W. J., and Harrison, J. K.** (1998). Chemokine receptor expression in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis.
J Neuroimmunol 86, 1-12.
71. **Jinquan, T., Quan, S., Jacobi, H. H., Madsen, H. O., Glue, C., Skov, P. S., Malling, H.-J., and Poulson, L. K.** (2000). CXC chemokine receptor 4 expression and stromal cell-derived factor-1 α -induced chemotaxis in CD4+ T lymphocytes are regulated by interleukin-4 and interleukin-10.
Immunology 99, 402-10.

72. **Jourdan, P., Abbal, C., Nora, N., Hori, T., Uchiyama, T., Vendrell, J.-P., Bousquet, J., Taylor, N., Pene, J., and Yssel, H.** (1998). IL-4 induces functional cell-surface expression of the CXCR4 on human T cells.
J Immunol 160, 4153-7.
73. **Kappler, J. W., Roehm, N., and Marrack, P.** (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus.
Cell 49, 273-80.
74. **Karpus, W. J., and Kennedy, K. J.** (1997). MIP-1a und MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation.
J Leukoc Biol 62, 681-7.
75. **Kerlero de Rosbo, N., Milo, R., Lees, M. B., Burger, D., Bernard, C. C., and Ben-Nun, A.** (1993). Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein.
J Clin Invest 92, 2602-8.
76. **Kerlero de Rosbo, N., Hoffman, M., Mendel, I., Yust, I., Kaye, J., Bakimer, R., Flechter, S., Abramsky, O., Milo, R., Karni, A., and Ben-Nun, A.** (1997). Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions.
Eur J Immunol 27, 3059-69.
77. **Kerlero de Rosbo, N., Brok, H. P. M., Bauer, J., Kaye, J. F., 't Hart, B. A., and Ben-Nun, A.** (2000). Rhesus monkeys are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein: characterisation of immunodominant T- and B- cell epitopes.
J Neuroimmunol 110, 83-96.
78. **Kesselring, J.** (1997). [Prognosis in multiple sclerosis]
Schweiz Med Wochenschr 127, 500-5.
79. **Kivisäkk, P., Trebst, C., Liu, Z., Tucky, B. H., Sörensen, T. L., Rudick, R. A., Mack, M., and Ransohoff, R. M.** (2002). T-cells in the cerebrospinal fluid express a similar repertoire of inflammatory chemokine receptors in the absence or presence of CNS inflammation: implications for CNS trafficking.
Clin Exp Immunol 129, 510-8.
79. **Klein, L., and Kyewski, B.** (2000). „Promiscuous“ expression of tissue antigens in the thymus: a key to T cell tolerance and autoimmunity?
J Mol Med 78, 483-94.

80. **Kroepfl, J. F., Viise, L. R., Charron, A. J., Linington, C., and Gardinier, M. V.** (1996). Investigation of myelin-oligodendrocyte glycoprotein membrane topology. *J Neurochem* 67, 2219-22.
81. **Kornek, B., Storch, M. K., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Olsson, T., Linington, C., Schmidbauer M., and Lassmann, H.** (2000). Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 157, 267-76.
82. **Kurtzke, J. F.** (1995). MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurol Scand Suppl* 161, 23-33
83. **Lassmann, H.** (1998). Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult Scler* 4, 93-8.
84. **Lee, B., Sharron, M., Montaner, L. J., Weissman, D., and Doms, R. W.** (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5215-20.
85. **Lee, S. J., and Benveniste, E. N.** (1999). Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 98, 77-88.
86. **Liang, M., Mallari, C., Rosser, M., Ng, H. P., May, K., Monahan, S., Bauman, J. G., Islam, I., Ghannam, A., Buckman, B., Shaw, K., Wei, G. P., Xu, W., Zhao, Z., Ho, E., Shen, J., Oanh, H., Subramanyam, B., Vergona, R., Taub, D., Dunning, L., Harvey, S., Snider, R. M., Hesselgesser, J., Morrissey, M. M., and Perez, H. D.** (2000). Identification and characterization of a potent, selective, and orally active antagonist of the CC chemokine receptor-1. *J Biol Chem* 275, 19000-8.
87. **Lindert, R. B., Haase, C. G., Brehm, U., Linington, C., Wekerle, H., and Hohlfeld, R.** (1999). Multiple sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Brain* 122, 2089-100.
88. **Lindley, I., Westwick, J., and Kunkel, S.** (1993). Nomenclature announcement: the chemokines. *Immunol Today* 14, 24.

89. **Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., and Vass, K.** (1988). Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulation mouse monoclonal antibodies directed against a myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 130, 443-54.
90. **Liu, Y., and Janeway, C. A.** (1990). Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *J Exp Med* 172, 1735-9.
91. **Loetscher, P., Seitz, M., Baggiolini, M., and Moser, B.** (1996a). Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 184, 569-77.
92. **Loetscher, P., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S. A., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B.** (1996b). Chemokine receptor specific for IP10 and MIG: structure, function, and expression in activated T-Lymphocytes. *J Exp Med* 184, 963-9.
93. **Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E., and Moser, B.** (1998). Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 28, 3696-3705.
94. **Lorentzen, J. C., Issazadeh, S., Storch, M., Mustafa, M. I., Lassman, H., Linington, C., Klareskog, L., and Olsson, T.** (1995). Protected, relapsing and demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats immunized with syngeneic spinal cord and incomplete Freud's adjuvant. *J Neuroimmunol* 63,193-205.
95. **Lucchinetti, C. F., Bruck, W., Rodriguez, M., and Lassmann, H.** (1996). Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6, 259-74.
96. **Luster, A. D., and Leder, P.** (1993). IP-10, a CXC chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 178, 1057-65.
97. **Luster, A. D., Greenberg, S. M., and Leder, P.** (1995). The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med* 182, 219-31.

98. **Luster, A. D.** (1998). Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation.
N Engl J Med 338, 436-445.
99. **Mackay, C. R., Marston, W., and Dudler, L.** (1992). Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge.
Eur J Immunol 22, 2205-10.
100. **Martin, R., Howell, M. D., Jaraquemada, D., Flerlage, M., Richert, J. R., Brostoff, S., Long, E. O., McFarlin, D. E., and McFarland, H. F.** (1991). A myelin basic protein peptide is recognized by cytotoxic T cells in the context of four HLA-DR types associated with multiple sclerosis.
J Exp Med 173, 19-24.
101. **Martin, R., McFarland, H. F., and McFarlin, D. E.** (1992 a). Immunological aspects of demyelinating diseases.
Annu Rev Immunol 10, 153-187.
102. **Martin, R., Utz, U., Coligan, J. E., Richert, J. R., Flerlage, M., Robinson, E., Stone, R., Biddison, W. E., McFarlin, D. E., and McFarland, H. F.** (1992 b). Diversity in fine specificity and T cell receptor usage of the human CD4+ cytotoxic T cell response specific for the immunodominant myelin basic protein peptide 87-106.
J Immunol 148, 1359-66.
103. **Martin, R., and McFarland, H. F.** (1995) Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis.
Crit Rev Clin Lab Sci 32, 121-82.
104. **Martinez-Caceres, E. M., Espejo, C., Brieva, L., Pericot, I., Tintore, M., Saez-Torres, I., and Montalban, X.** (2002). Expression of chemokine receptors in the different clinical forms of multiple sclerosis.
Multiple Sclerosis 8, 390-5.
105. **Martini, R., and Schachner, M.** (1997). Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules.
Glia 19, 298-310.
106. **McDevitt, H. O.** (1998). The role of MHC class II molecules in susceptibility and resistance to autoimmunity.
Curr Opin Immunol 10, 677-81.

107. **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., and 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.
108. **McFarlin, D. E., McFarland, H. F.** (1982). Multiple sclerosis (Part 1). *New Engl J Med* 307, 1183-8.
109. **McFarlin, D. E., McFarland, H. F.** (1982). Multiple sclerosis (Part 2). *New Engl J Med* 307, 1246-51.
110. **Miller, A.** (1998). Diagnosis of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 18, 309-16.
111. **Miller, D. H., Barkhof, F., and Nauta, J. J.** (1993). Gadolinium enhancement increases the sensitivity of MRI in detecting disease activity in multiple sclerosis. *Brain* 116, 1077-94.
112. **Miso, T., Onodera, H., Fujihara, K., Matsushima, K., Yoshie, O., Okita, N., Takase, S., and Itoyama, Y.** (2001). Chemokine receptor expression on T cells in blood and cerebrospinal fluid at relapse and remission of multiple sclerosis: imbalance of Th1/Th2-associated chemokine signaling. *J Neuroimmunol* 114, 207-12.
113. **Miyagishi, R., Kikuchi, S., Fukuzawa, T., and Tashiro, K.** (1995). Macrophage inflammatory protein-1 α in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases. *J Neurol Sci* 84, 238-49.
114. **Miyagishi, R., Kikuchi, S., Takayama, C., Inoue, Y., and Tashiro, K.** (1997). Identification of cell types producing RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β in rat experimental autoimmune encephalomyelitis by in situ hybridization. *J Neuroimmunol* 77, 17-26.
115. **Mo, H., Monard, S., Pollack, H., Ip, J., Rochford, G., Wu, L., Hoxie, J., Borkowsky, W., Ho, D. D., and Moore, J. P.** (1998). Expression patterns of the HIV type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on CD4+ T cells and monocytes from cord and adult blood. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14, 607-17.

116. **Muraro, P. A., Vergelli, M., Kalbus, M, Banks, D. E., Nagle, J. W., Tranquill, L. R., Nepom, G. T., Biddison, W. E., McFarland, H. F., and Martin, R.** (1997). Immunodominance of a low-affinity major histocompatibility complex-binding myelin basic protein epitope (residues 111-129) in HLA-DR4 (B1*0401) subjects is associated with a restricted T cell receptor repertoire.
J Clin Invest 100, 339.
117. **Murphy, P. M.** (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors.
Annu Rev Immunol 12, 593-633.
118. **Nagasawa, T., Kikutani, H. and Kishimoto, T.** (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor.
Proc Natl Acad Sci USA 91, 2305-9.
119. **Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y. Yoshida, N., Kikutani, H., Kishimoto, T.** (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1.
Nature 382, 635-8.
120. **Navikas, V., and Link, H.** (1996). Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis.
J Neurosci Res 45, 322-33.
121. **Neumann, H., Cavalie, A., Jenne, D. E., and Wekerle, H.** (1995). Induction of MHC class I genes in neurons.
Science 269, 549-52.
122. **Neumann, H., and Wekerle, H.** (1998). Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration
J Neuropathol Exp Neurol 57, 1-9.
123. **Nibbs, R. J., Wylie S. M., Yang, J., Landau, N. R., and Graham, G. J.** (1997). Cloning and characterization of a novel promiscuous human beta-chemokine receptor D6.
J Biol Chem 272, 3278-83.
124. **Nyland, H., mork, S., and Matre, R.** (1982). In-situ characterization of mononuclear cell infiltrates in lesions of multiple sclerosis.
Neuropath Appl Neurobiol 8, 403-11.

125. **Oksaranta, O., Tarvonen, S., Ilonen, J., Poikonen, K., Reunanen, M., Panelius, M., and Salonen, R.** (1996). T-cell subpopulations in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis: a follow-up study. *Neurology* 47, 1542-5.
126. **Oldstone, M. B. A.** (1987). Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50, 810-20.
127. **Olerup, O. and Hillert, J.** (1991). HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38, 1-15.
128. **Olsson, T.** (1992). Immunology of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 5, 195-202.
129. **Olsson, T., Sun, J., Hillert, J., Hojeberg, B., Ekre, H. P., Andersson, G., Olerup, O., and Link, H.** (1992). Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 22, 1083-7.
130. **Olsson, T.** (1995 a). Critical influences of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* 144, 245-68.
131. **Olsson, T.** (1995 b). Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurology* 45 (suppl 6), S11-15.
132. **Ota, K., Matsui, M., Milford, E. L., Mackin, G. A., Weiner, H. L., and Hafler, D. A.** (1990). T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346, 183-7.
133. **Pashenkov, M., Teleshova, N., Kouwenhoven, M., Kostulas, V., Huang, Y.-M., Söderström, M., and Link, H.** (2002). Elevated expression of CCR5 by myeloid (CD11c+) blood dendritic cells in multiple sclerosis and acute optic neuritis. *Clin Exp Immunol* 127, 519-26.
134. **Pelfrey, C. M., Trotter, J. L., Tranquill, L. R., and McFarland, H. F.** (1993). Identification of a novel T cell epitope of human proteolipid protein (residues 40-60) recognized by proliferative and cytolytic CD4+ T cells from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmun* 46, 33-42.

135. **Pelfrey, C. M., Trotter, J. L., Tranquill, L. R., and McFarland, H. F.** (1994). Identification of a second T cell epitope of human proteolipid protein (residues 89-106) recognized by proliferative and cytolytic CD4+ T cells from multiple sclerosis patients.
J Neuroimmun 53, 153-61.
136. **Penton-Rol, G., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti, A., Mancinelli, R., Sica, A., Sozzani, S., and Mantovani, A.** (1998). Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma.
J Immunol 160, 3869-73.
137. **Pette, M., Fujita, K., Kitze, B., Whitaker, J. N., Albert, E., Kappos, L., and Wekerle, H.** (1990). Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals.
Neurology 40, 1770-6.
138. **Pettinelli, C. B., and McFarlin, D. E.** (1981). Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes.
J Immunol 127, 1420-3.
139. **Pham-Dinh, D., Mattei, M. G., Nussbaum, J. L., Roussel, G., Pontarotti, P., Roedel, N., Mather, I. H., Artzt, K., Lindahl, K. F., and Dautigny, A.** (1993). Myelin-oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex.
Proc Natl Acad Sci USA 90, 7990-4.
140. **Piddlesden, S. J., Lassmann, H., Zimprich, F., Morgan, B. P., and Lington, C.** (1993). The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement.
Am J Pathol 143, 555-64.
141. **Poser, C. M., Paty, D. W., Scheinberg, L., McDonald, W. I., Davis, F. A., Ebers, G. C., Johnson, K. P., Sibley, W. A., Silberberg, D. H., and Tourtellotte, W. W.** (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols.
Ann Neurol 13, 227-31.
142. **Poser, S., Wikstrom, J., and Bauer, H. J.** (1979). Clinical data and the identification of special forms of multiple sclerosis in 1271 cases studied with a standardized documentation system.
J Neurol Sci 40, 159-68.

143. **Poser, S., Scheidt, P., Kitze, B., Luer, W., Schafer, U., Nordmann, B., and Stichnoth, F. A.** (1991). Impact of magnetic resonance imaging (MRI) on the epidemiology of MS.
Acta Neurol Scand 83, 172-5.
144. **Pribyl, T. M., Campagnoni, C., Kampf, K., Handley, V. W., and Campagnoni, A. T.** (1996). The major myelin protein genes are expressed in the human thymus.
J Neurosci Res 45, 812-9.
145. **Prineas, J. W., and Wright, R. G.** (1978). Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis.
Lab Invest 38, 409-21.
146. **Qin, S., Rottman, J., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A. E., Moser, B., Mackay, C. R.** (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions.
J Clin Invest 101, 746-54.
147. **Raine, C. S.** (1990). Demyelinating diseases. In: *Textbook of Neuropathology*. Davis, R. L., Robertson, D. M. (eds). Williams & Wilkins. Baltimore, pp535-620.
148. **Ransohoff, R. M.** (1999). Mechanisms of inflammation in MS tissue: adhesion molecules and chemokines.
J Neuroimmunol 98, 57-68.
149. **Ransohoff, R. M.** (2002). The chemokine system in neuroinflammation: an update.
JID 186(suppl.2), 152-6.
150. **Reindl, M., Linington, C., Brehm, U., Egg, R., Dilitz, E., Deisenhammer, F., Poewe, W., and Berger, T.** (1999). Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study.
Brain 122, 2047-56.
151. **Rieckmann, P., Albrecht, M., Kitze, B., Weber, T., Tumani, H., Broocks, A., Luer, W., Helwig, A., and Poser, S.** (1995). Tumor-necrosis-factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity.
Ann Neurol 37, 82-8.

152. **Rottman, J. B., Slavin, A. J., Silva, R., Weiner, H. L., Gerard, C. G., and Hancock, W. W.** (2000). Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent. *J Biol Chem* 273, 15687-92.
153. **Sadovnick, A. D., Baird, P. A., and Ward, R. A.** (1988). Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet* 29, 533-41.
154. **Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A.** (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187, 875-83.
155. **Sallusto, F., Mackay, C. R., and Lanzavecchia A.** (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277, 2005-7.
156. **Salomon, B., Lenschow, D. J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J. A.** (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431-40.
157. **Sawcer, S., Jones, H. B., Feakes, R., Gray, J., Smaldon, N., Chataway, J., Robertson, N., Calyton, D., Goodfellow, P. N., and Compston, A.** (1996). A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nature Genet* 13, 464-9.
158. **Sawcer, S., and Goodfellow, P. N.** (1998). Inheritance of susceptibility to multiple sclerosis. *Curr Opin Immunol* 10, 697-703.
159. **Seddon, B., and Mason, D.** (1999). Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J Exp Med* 189, 877-82.
160. **Selmaj, K., and Raine, C. S.** (1988). Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 23, 339-46.
161. **Scheinecker, C., McHugh, R., Shevach, E. M., and Germain, R. N.** (2002). Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 196, 1079-90.

162. **Schumacher, G. A., Beebe, G., Kibler, R. F., Kurland, L. T., Kurtzke, J. F., and McDowell, F.** (1965). Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel of the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 122, 552-568.
163. **Sellebjerg, F., Madsen, H. O., Jensen, C. V., Jensen, J., and Garred, P.** (2000). CCR5 d32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 102, 98-106.
164. **Sha, W. C., Nelson, C. A., Newberry, R. D., Kranz, D. M., Russell, J. H., and Loh, D. Y.** (1988). Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 336, 73-6.
165. **Sharief, M. K., and Hentges, R.** (1991). Association between tumor necrosis factor alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 325, 467-72.
166. **Sharief, M. K., Noori, M. A., Ciardi, M., Cirelli, A., and Thompson, E. J.** (1993). Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis. Correlation with TNF-alpha and blood-brain barrier damage. *J Neuroimmunol* 43, 15-21.
167. **Sharon, R. V., and Sadun, A.** (1996). The emotional impact of MS diagnosis. *N J Med* 93, 47-51.
168. **Simpson, J., Rezaie, P., Newcombe, J., Cuzner, M. L., Male, D., and Woodroffe, M. N.** (2000a). Expression of the β -chemokine receptor CCR2, CCR3, CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol* 108, 192-200.
169. **Simpson, J. E., Newcombe, J., Cuzner, M. L., and Woodroffe, M. N.** (2000b). Expression of the interferon-gamma-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3 in multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26, 133-42.
170. **Sindern, E., Patzold, T., Ossege, L. M., Gisevius, A., and Malin, J. P.** (2002). Expression of chemokine receptor CXCR3 on cerebrospinal fluid T cells is related to active MRI lesion appearance in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 131, 186-90.

171. **Soldan, S. S., Berti, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L., Calabresi, P. A., Brennan, M. B., Maloni, H. W., McFarland, H. F., Li, H., Patnaik, M., and Jacobson, S.** (1997). Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: Increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nature Medicine* 12, 1394-7.
172. **Sommer, N., Löschmann, P. A., Northoff, G. H., Weller, M., Steinbrecher, A., Steinbach, J. P., Lichtenfels, R., Meyermann, R., Riehtmüller, A., Fontana, A., Dichgans, J., and Martin, R.** (1995). The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 1, 244-8.
173. **Sörensen, T. L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V. A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R. M., Frederiksen, J. L., and Ransohoff, R. M.** (1999). Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 103, 807-15.
174. **Sörensen, T. L., Trebst, C., Kivisäkk, P., Klaege, K. L., Majmudar, A., Ravid, R., Lassmann, H., Olsen, D. B., Strieter, R. M., Ransohoff, R. M., and Sellebjerg, F.** (2002). Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J Neuroimmunol* 127, 59-68.
175. **Sospedra, M., Ferrer-Francesch, X., Dominguez, O., Juan, M., Foz-Sala, M., and Pujol-Borrell, R.** (1998). Transcription of a broad range of self- antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol* 161, 5918-29.
176. **Springer, T. A.** (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-14.
177. **Spurkland, A., Ronningen, K. S., Vandvik, B., Thorsby, E., and Vartdal, F.** (1991). HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes may jointly determine susceptibility to develop multiple sclerosis. *Hum Immunol* 30, 69.
178. **Stefflerl, A., Schubart, A., Storch, M., Amini, A., Mather, I., Lassmann, H., and Linington, C.** (2000). Butyrophilin, a milk protein, modulates the encephalitogenic T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 165, 2859-65.

179. **Steinbrecher, A., Dichgans, J., and Martin, R.** (1995). Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose. *Nervenheilkunde* 14, 180-8.
180. **Steinman, L., Waisman, A., and Altman, D.** (1995). Major T cell responses in multiple sclerosis. *Mol Med Today* 79-83.
181. **Steinman, L.** (1996). Multiple Sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85, 299-302.
182. **Stenager, E., Stenager, E. N., and Jensen, K.** (1996). Sexual function in multiple sclerosis. A 5-year follow-up study. *Ital J Neurol Sci* 17, 67-9.
183. **Storch, M. K., Stefferl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallstrom, E., Kerschensteiner, M., Olsson, T., Linington, C., and Lassmann, H.** (1998). Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8, 681-94.
184. **Storch, M. K., Weissert, R., Steffer, A., Birnbacher, R., Wallstrom, E., Dahlman, I., Ostensson, C. G., Linington, C., Olsson, T., and Lassmann, H.** (2002). MHC gene related effects on microglia and macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis determine the extent of axonal injury. *Brain Pathol* 12, 287-99.
185. **Streilein, J. W.** (1993). Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. *Curr Opin Immunol* 5, 428-32.
186. **Strieter, R. M., Polverini, P. J., Arenberg, D. A., Walz, A., Opdenakker, G., Van Damme, J., and Kunkel, S. L.** (1995). Role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol* 57, 752-62.
187. **Sun, J. B., Olsson, T., Wang, W. Z., Xiao, B. G., Kostulas, V., Fredrikson, S., Ekre, H. P., and Link, H.** (1991). Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls. *Eur J Immunol* 21, 1461-8.

188. **Suzuki, G., Nakata, Y., Dan, Y., Uzawa, A., Nakagawa, K.-I., Saito, T., Mita, K., and Shirasawa, T.** (1998). Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus. *Int Immunol* 10, 1049-56.
189. **Taub, D. D., Lloyd, A. R., Conlon, K., Ming Wang, J., Ortaldo, J R., Harada, A., Matsushima, K., Kelvin, D. J., and Oppenheim, J. J.** (1993). Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 177, 1809-14.
190. **Teleshova, N., Pashenkov, M., Huang, Y.-M., Söderström, M., Kivisäkk, P., Kostulas, V., Haglund, M., and Link, H.** (2002). Multiple sclerosis and optic neuritis: CCR5 and CXCR3 expressing T cells are augmented in blood and cerebrospinal fluid. *J Neurol* 249, 723-9.
191. **Trapp, B. D., Peterson, J., Pansohoff, R. M., Rudick, R., Mork, S., and Bo, L.** (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338, 278-85.
192. **Trapp, B. D., Pansohoff, R. M., and Rudick, R.** (1999). Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 12, 295-302.
193. **Traugott, U., Reinherz, E. L., and Raine, C. S.** (1983). Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol* 4, 201-21.
194. **Traugott, U.** (1987). Multiple sclerosis: relevance of class I and class II MHC-expressing cells to lesion development. *J Neuroimmunol* 16, 283-302.
195. **Trotter, J. L., Hickey, W. F., van der Veen, R. C., and Sulze, L.** (1991). Peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients recognize myelin proteolipid protein and selected peptides. *J Neuroimmunol* 33, 55-62.
196. **Vartanian, T., Li, Y., Zhoa, M., Stefansson, K.** (1995). Interferon-gamma induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1, 732-43.

197. **Vass, K., and Lassmann, H.** (1990). Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system.
Am J Pathol 137, 789-800.
198. **Viret, C., Wong, F. S., and Janeway, C. A.** (1999). Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition.
Immunity 10, 559-68.
199. **Vyse, T. J., and Todd, J. A.** (1996). Genetic analysis of autoimmune disease.
Cell 85, 311-8.
200. **Waksman, B. H.** (1995). Multiple sclerosis. More genes versus environment.
Nature 377, 148-51.
201. **Wallstrom, E., Khademi, M., Andersson, M., Weissert, R., Linington, C., and Olsson, T.** (1998). Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15)+ multiple sclerosis.
Eur J Immunol 28, 3329-35.
202. **Wang, J., Guan, E., Roderiquez, G., Calvert, V., Alvarez, R., and Norcross, M. A.** (2001). Role of the tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages.
J Biol Chem 276, 49236-43.
203. **Ward, S. G., and Westwick, J.** (1998). Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology.
Biochem J 333, 457-70.
204. **Weinshenker, B. G., Bass, B., Rice, G. P., Noseworthy, J., Carriere, W., Baskerville, J., and Ebers, G. C.** (1989). The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 1. Clinical course and disability.
Brain 112, 133-46.
205. **Weinshenker, B. G., Bass, B., Rice, G. P., Noseworthy, J., Carriere, W., Baskerville, J., and Ebers, G. C.** (1989). The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course.
Brain 112, 1419-28.

206. **Weissert, R., Wallstrom, E., Storch, M. K., Stefferl, A., Lorentzen, J., Lassmann, H., Linington, C., and Olsson, T.** (1998). MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. *J Clin Invest* 102, 1265-73.
207. **Weissert, R., Kuhle, J., de Graaf, K. L., Wienhold, W., Herrmann, M. M., Müller, C., Forsthuber, T. G., Wiesmüller, K. H., and Melms, A.** (2002). High immunogenicity of intracellular myelin oligodendrocyte glycoprotein epitopes. *J Immunol* 169, 548-56.
208. **Wekerle, H., Linington, C., Lassmann, H., and Meyermann, R.** (1986). Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 9, 171-7.
209. **Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., and Linington, C.** (1994). Animal models. *Ann Neurol* 36, S47-53.
210. **Xie, J. H., Nomura, N., Lu, M., Chen, S. L., Koch, G. E., Weng, Y., Rosa, R., Di Salva, J., Mudgett, J., Peterson, L. B., Wicker, L. S., and DeMartino, J. A.** (2003). Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *J Leukoc Biol* 73, 7771-80.
211. **Yaouanq, J., Semana, G., Eichenbaum, S., Quelvennec, E., Roth, M. P., Clanet, M., Edan, G., and Clerget-Darpoux, F.** (1997). Evidence for linkage disequilibrium between HLA-DRB1 gene and multiple sclerosis. *Science* 276, 664-5.
212. **Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E. A., Appella, E., Oppenheim, J. J., and Leonard, E. J.** (1987). Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 9233-7.
213. **Zang, Y. C., Samanta, A. K., Halder, J. B., Hong, J., Tejada-Simon, M. V., Rivera, V. M., and Zhang, J. Z.** (2000). Aberrant T cell migration toward RANTES and MIP-1 alpha in patients with multiple sclerosis. Over-expression of chemokine receptor CCR5. *Brain* 123, 1874-82.
214. **Zang, Y. C., Halder, J. B., Samanta, A. K., Hong, J., Rivera, V. M., and Zhang, J. Z.** (2001). Regulation of chemokine receptor CCR5 and production of RANTES and MIP-1 α by interferon- β . *J Neuroimmunol* 112, 174-80.

215. **Zingoni, A., Soto, H., Hedrick, J. A., Stoppacciaro, A., Storlazzi, C. T., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., O'Garra, A., Robinson, D., Rocchi, M., Santoni, A., Zlotnik, A., and Napolitano, M.** (1998). The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol* 161, 547-51
216. **Zou, Y-R., Kottman, A. H., Koruda, M., Taniuchi, I., and Littman, D. R.** (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-9.

Danksagung

Mein Dank geht in erster Linie an Herrn PD Dr. Dr. Robert Weissert für die freundliche Überlassung des Themas, die kompetente Führung und die gute Betreuung. Sein großes Engagement, die kritischen und motivierenden Diskussionen und die ständige Ansprechbarkeit haben diese Doktorarbeit möglich gemacht.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Andrea Viskorf, die mich über weite Strecken dieser Doktorarbeit hervorragend betreut und mir viel beigebracht hat.

Außerdem danke ich Frau Dr. Katrien de Graaf für die Einweisung in die Laborarbeit und die überaus große Hilfsbereitschaft in sehr vielen Bereichen.

Ferner danke ich Frau Dr. Susanne Gärtner und Herrn Dr. Jens Kuhle, meinen Vorgängern, für die nette und hilfsbereite Unterrichtung in den verschiedenen zellbiologischen Methoden.

Daneben möchte ich mich bei allen im Labor für die freundschaftliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Frau Silvia Barth, die mir mit beispielloser Geduld stets eine sehr große und wertvolle Hilfe gewesen ist.

Mein herzlicher Dank geht an meine Eltern, denen ich alles zu verdanken habe.

LEBENS LAUF

Name : Marcus Hussam Ahrends
Geburtsdatum : 05. August 1978
Geburtsort : Ostfildern-Ruit
Familienstand : ledig
Staatsangehörigkeit : deutsch
Eltern : Eva und Hans-Joachim Ahrends

Schulbildung:

August 1984 - Juli 1988 Grundschule Lichtenwald
August 1988 - Juli 1989 Gymnasium Plochingen
August 1989 - Juni 1997 Geschwister-Scholl-Gymnasium Stuttgart-Sillenbuch
Abschluß : Abitur

Studium:

Seit Okt. 1998 Medizin in Tübingen
August 2000 Physikum
August 2001 1. Staatsexamen
März 2004 2. Staatsexamen

April 04 - März 05 Praktisches Jahr in
1. Terial: Schaffhausen, CH (Chirurgie)
2. Terial: University Hospital of Kuala Lumpur, MAS
(Innere Medizin)
3. Terial: Bürgerhospital Stuttgart (Neurologie)

25. Mai 2005 3. Staatsexamen