

**Aus dem Zentrum für Neurologie der Universität Tübingen
Neurologische Klinik und Hertie-Institut für klinische Hirnforschung**

Abteilung Allgemeine Neurologie

Kommissarischer Leiter: Professor Dr. A. Melms

**Mechanismen zur Entstehung von Autoimmunität
im Zentralnervensystem**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Bastian Amend
aus
Marbach am Neckar**

2008

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. A. Melms

2. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Röcken

**In Dankbarkeit
meinen Eltern, meiner Frau
und meinen Großeltern
gewidmet**

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	VI
1.	Einleitung	1
1.1.	Allgemeine Einleitung.....	1
1.2.	Grundlagen des Immunsystems.....	3
1.2.1.	Aufgaben des Immunsystems.....	3
1.2.2.	Komponenten des Immunsystems.....	3
1.3.	Multiple Sklerose.....	9
1.3.1.	Allgemeines.....	9
1.3.2.	Epidemiologie.....	9
1.3.3.	Klinische Symptomatologie.....	10
1.3.4.	Ätiologie und Pathogenese.....	10
1.3.5.	Therapie und Prognose.....	12
1.4.	Experimentell autoimmune Enzephalomyelitis.....	12
1.5.	Pertussistoxin.....	14
1.5.1.	Herkunft, Struktur und Aufbau des PTX.....	14
1.5.2.	Funktion und Wirkung des PTX und dessen Untereinheiten.....	14
1.5.3.	Pertussistoxin und EAE.....	16
1.5.4.	Die Wirkung von PTX auf APCs.....	17
1.6.	Apoptose.....	19
1.6.1.	Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose.....	19
1.6.2.	Mechanismen der Apoptose.....	20
1.6.3.	Methoden zum Apoptosenachweis.....	20
1.7.	Tetramere von MHC Klasse II / Peptid Komplexen zur direkten Darstellung spezifischer T-Helfer-Zellen innerhalb eines normalen, polyklonalen T-Zell-Repertoires.....	21
1.8.	Zusammenfassung der Fragestellungen dieser Arbeit.....	22
2.	Material und Methoden	23
2.1.	Material.....	23
2.1.1.	Tabelle der verwendeten Laborgeräte.....	23

2.1.2.	Tabelle der verwendeten Laborverbrauchsmaterialien	24
2.1.3.	Tabelle kommerzieller Medien, Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	24
2.1.4.	Tabelle der verwendeten Antikörper	26
2.1.5.	Erythrozyten-Lyse-Puffer.....	26
2.1.6.	Komplettes Zellkulturmedium (cIMDM)	26
2.1.7.	ZNS-Verdau-Lösung	27
2.1.8.	Percollverdünnungen	27
2.1.9.	FACS-Puffer.....	27
2.1.10.	Annexin V-binding buffer	27
2.1.11.	CD16/CD32 (Fc γ RIII/Fc γ RII) Antikörper-Verdünnung.....	28
2.1.12.	Antikörperverdünnungen	28
2.1.13.	Propidiumjodidverdünnung.....	29
2.1.14.	SJL/JHanHsd – Mäuse.....	29
2.1.15.	Herstellung der Peptide PLP 139-151 und MBP 84-96	29
2.1.16.	Färbelösungen für die HE-Färbung.....	30
2.2.	Methoden.....	30
2.2.1.	Herstellung einer Peptid-Wasser-Öl-Emulsion zur Immuni- sierung von Mäusen.....	30
2.2.2.	Immunisieren von Mäusen	31
2.2.3.	Festlegung des Krankheitsgrades einer Maus – Krankheits- score	31
2.2.4.	Zentrifugieren von Zell- und Organsuspensionen	32
2.2.5.	Herstellung der PLP- und MBP-Tetramere.....	32
2.2.6.	Titration der PLP- und MBP- Tetramere.....	34
2.2.7.	Mauspräparation	34
2.2.8.	Isolation der Lymphozyten aus den drainierenden Lymph- knoten (DLN).....	36
2.2.9.	Isolation der Lymphozyten aus der Milz	36
2.2.10.	Isolation der Lymphozyten aus dem ZNS.....	36
2.2.11.	Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe der Neubauer- zählkammer.....	38

2.2.12. Aussäen und Färbung von Zellen mit MHC-Klasse II-Tetrameren.....	39
2.2.13. Färbung von Zellen mit Antikörpern	39
2.2.14. Apoptosenachweis mit Annexin V	40
2.2.15. FACS-Gerät und FACS Messung	41
2.2.16. Auswertung der Daten.....	43
2.2.17. Herstellung von ZNS-Gefrierschnitten für HE-Histologie.....	46
2.2.18. Herstellung von ZNS-Gefrierschnitten für die Immunfluoreszenz.....	47
2.2.19. Durchführung der Standard HE-Färbung an ZNS-Gefrierschnitten.....	48
2.2.20. Durchführung von Immunfluoreszenzfärbungen an ZNS-Gefrierschnitten.....	49
2.2.21. Liste der Färbeprotokolle besonderer Immunfluoreszenzfärbungen	50
2.2.22. Mikroskopie und Digitalisierung von HE-gefärbten ZNS-Gefrierschnitten.....	50
2.2.23. Mikroskopie und Digitalisierung von Immunfluoreszenzgefärbten ZNS-Gefrierschnitten	51
3. Ergebnisse	52
3.1. Krankheitsverläufe der EAE innerhalb der Versuchsgruppen	52
3.2. HE-Histologie von Kleinhirn und Rückenmark	53
3.2.1. Histologische Untersuchung von gesunden, nativen Mäusen als Negativkontrolle.....	55
3.2.2. Histologische Untersuchung von immunisierten Mäusen mit Pertussistoxininjektion.....	55
3.2.3. Histologische Untersuchung von immunisierten Mäusen ohne Pertussistoxininjektion.....	58
3.3. Gesamtzellzahlen in den einzelnen Organen.....	60
3.3.1. Gesamtzellzahl der drainierenden Lymphknoten	60
3.3.2. Gesamtzellzahl der Milz	61
3.3.3. Gesamtzellzahl des Zentralnervensystems.....	61

3.4.	Gesamtzellzahlen der CD4-positiven Zellen in Lk, Milz und ZNS	62
3.4.1.	CD4-positiv e Zellen in den Popliteallymphknoten	62
3.4.2.	CD4-positiv e Zellen in der Milz.....	63
3.4.3.	CD4-positiv e Zellen im Zentralnervensystem.....	63
3.5.	Populationsdynamik antigenspezifischer T-Helfer-Zellen in Lk, Milz und ZNS+	64
3.5.1.	Analyse tetramerpositiver T-Helfer-Zellen im Lymphknoten.....	66
3.5.2.	Analyse tetramerpositiver T-Helfer-Zellen in der Milz.....	68
3.5.3.	Analyse tetramerpositiver T-Helfer-Zellen im ZNS	71
3.6.	Phänotypisierung der CD4 positiven Lymphozyten bezüglich der Aktivierungsmarker CD44 und CD69.....	73
3.7.	CD40 Ligand Expression der CD4 positiven Zellen in Peripherie und ZNS	78
3.8.	Nachweis von Apoptose beziehungsweise von Oberflächen- markern innerhalb der Apoptosesignalwege.....	80
3.8.1.	Expression von CD95 (Fas)	80
3.8.2.	Expression von CD95 Ligand (Fas Ligand).....	83
3.8.3.	Apoptosenachweis mittels Annexin V und Propidiumjodid	86
3.9.	Ergänzende Immunfluoreszenzhistologie	88
3.9.1.	Nachweis CD4 und CD8 positiver Zellen innerhalb von ZNS- Läsionen.....	88
3.9.2.	Expression der Oberflächenmarker CD44, CD95, B220 und Anfärbung von Neurofilamenten in ZNS-Infiltraten.....	91
3.9.3.	Milzhistologie mit MOMA.....	92
4.	Diskussion	96
4.1.	Induktion von Autoimmunität durch Pertussistoxin – Zentral oder Peripher?.....	96
4.2.	Pertussistoxin führt zur früheren Aktivierung von CD4 Zellen in Lymphknoten.....	98
4.3.	Verhalten von antigenspezifischen CD4+ Zellen in der Milz	99
4.3.1.	PTX verhindert nicht das Eintreten von CD4+ Zellen in die weiße Milzpulpa	99

4.3.2.	PTX führt innerhalb der Milz zur erhöhten Gesamtzellzahl von Lymphozyten, T-Helfer-Zellen und PLP-spezifischen CD4+ Zellen	100
4.3.3.	CD4+ und PLP-spezifische CD4+ Zellen wandern unter PTX Gabe von der Milz ins ZNS	101
4.4.	PLP-spezifische T-Helfer-Zellen im ZNS zeigen CD44+/CD69+ Phänotyp	102
4.5.	CD 40 Ligand – Kostimulatorisches Molekül oder Vermittler ins ZNS	103
4.6.	Konstitutive Expression von CD95 (Fas) auf CD4+ Zellen - Definition einer Population CD95high	104
4.7.	CD95 Ligand (Fas Ligand) – Effektormechanismen im ZNS.....	106
4.8.	Activation induced cell death (AICD) – ein mögliches Modell zur Erklärung der Fas/Fas Ligand-Induktion nach Aktivierung	107
4.9.	Weiterentwicklung des Projektes - Möglichkeiten einer therapeutischen Intervention in der Zukunft	109
4.9.1.	Erneute periphere Populationsdynamik während der Erkrankungsphase	109
4.9.2.	Weitere Phänotypisierung PLP-spezifischer CD4+ Zellen	110
4.9.3.	Therapiestrategien	110
5.	Zusammenfassung	112
III	Abbildungen	114
IV	Tabellen	120
V	Literaturverzeichnis	121
VI	Danksagung	128
VII	Lebenslauf	129

II Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvants
Cy-3	Indocarbocyanin
DLN	Drainierende Lymphknoten
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSC	Forward scatter, Vorwärtsstreuung
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Human Leukocyte Antigen
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IFA	Inkomplettes Freund'sches Adjuvants
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
Lkn	Lymphknoten
MBP	Myelin basic protein, Myelin-Basisprotein
MDS	Mean disease score
MHC	Major Histocompatibiliy Complex
Mio.	Million(en)
MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein, Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
Tm	Tetramer
PBS	Phosphat buffered saline
PE	R-Phycoerythrin
p.i.	post immunization
PI	Propidiumjodid

Abkürzungsverzeichnis

PLP	Myelin proteolipid protein, Proteolipid Protein
PS	Phosphatidylserin
PTX	Pertussistoxin
s.c.	subkutan
TNF	Tumornekrosefaktor
SEM	Standard error of the mean
SSC	Sideward scatter, Seitwärtsstreuung
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einleitung

Das Immunsystem des Menschen stellt sich bei näherem Betrachten als ein Organsystem dar, dessen Grenzen mit dem heutigen Stand der Wissenschaft nicht eindeutig abgesteckt werden können. Das Immunsystem hat für den menschlichen Organismus lebenswichtige Funktionen: Infektionen durch unterschiedlichste Krankheitserreger, seien es Bakterien, Viren oder Pilze, können vom menschlichen Körper gut bewältigt werden. Allerdings hat jedes System, sei es noch so perfekt, seine Lücken und Fehlreaktionen. Zum einen muss sich der menschliche Körper oftmals trotz größten Einsatzes schweren Infektionen beugen, zum anderen kennt die Medizin eine Fülle von Erkrankungen, bei denen sich das „Organ“ Immunsystem gegen den eigenen Körper richtet. Diese Formen von Erkrankungen sind mit der Bezeichnung „Autoimmunerkrankungen“ überschrieben. Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, Systemischer Lupus erythematodes, die Progressive systemische Sklerodermie, Diabetes mellitus Typ I oder die Myasthenia gravis stellen nur eine kleine Auswahl an Autoimmunerkrankungen dar. Aber schon am Beispiel des Diabetes mellitus Typ I wird deutlich, dass es sich um Erkrankungen handelt, die in unserer Gesellschaft häufig auftreten.

Gerade die jüngste Vergangenheit hat aufgezeigt, dass erst die Grundlagenforschung neue Mittel und Wege in der Therapie verschiedenster Erkrankungen ermöglicht, insbesondere gilt dies auch für die Gruppe der Autoimmunerkrankungen. Um Zugang zu den zell- und molekularbiologischen Mechanismen des Immunsystems, dem Mittelpunkt der Autoimmunerkrankung, zu erlangen, ist es unumgänglich, Tiermodelle für die verschiedenen Erkrankungen zu entwickeln und als Forschungsgrundlage zu verwenden.

Diese Arbeit stellt die Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) in den Mittelpunkt der Überlegungen und Versuche. Die EAE wird bei Mäusen und Ratten als Modellerkrankung für die Multiple Sklerose – auch als Enzephalitis disseminata bezeichnet – verwendet. Schon in den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts hat Rivers in Tierversuchen die Grundlagen für die Experimentelle

Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) [1] geschaffen. Mit vielfältigen Weiterentwicklungen bietet sie heute die Möglichkeit einer leicht zugänglichen Grundlagenforschung an Mäusen und Ratten.

Weltweit leiden 1 Million Menschen an MS. Auffallend ist ein Geschlechterverhältnis für Frauen gegenüber Männern von 2:1 [2]. Obwohl in den letzten Jahren einige Medikamente entwickelt wurden, mit denen der Krankheitsverlauf beeinflusst werden kann, gibt es für diese große Anzahl an Patienten bis jetzt keine Therapie, mit der diese oft mit zunehmender Behinderung einhergehende Erkrankung geheilt oder vollständig unterdrückt werden kann. Um dem Ziel einer therapeutischen Möglichkeit zur Heilung näher zu kommen, gilt es, schrittweise immunologische Grundlagen zu erarbeiten. Während und vor allem am Ende eines Forschungsabschnittes gehen die Überlegungen stets dahin, die am Tiermodell errungenen Grundlagen und Therapieansätze möglichst optimal auf den Patienten und seine Erkrankung umzusetzen. Die Übertragung vom Tiermodell auf den Menschen bietet Chancen und Möglichkeiten neue Therapieschemata zum Wohl des Patienten einzubringen; allerdings sollte man zu jeder Zeit die Grenzen dieser Übertragung erkennen und sensibel jede Einzelheit neuer Forschungsergebnisse prüfen.

Im Zentrum der Fragestellung dieser Arbeit befinden sich zwei wichtige Begriffe: Pertussistoxin und Apoptose. In den nachfolgenden Abschnitten soll auf diese beiden Begriffe hingeführt und detailliert eingegangen werden. Den Begriff Pertussistoxin finden wir im Bereich der Auslösung der Modellerkrankung EAE wieder, hier sollen neue Aufschlüsse über die Funktion und die Auswirkungen dieses Effektormoleküls auf das Immunsystem gewonnen werden. Mit dem zweiten Begriff der Apoptose, einer Bezeichnung für den „programmierten Zelltod“, soll darauf eingegangen werden, was mit den Zellen des Immunsystems nach vollbrachter „Arbeit“ geschieht - bleiben diese Zellen in gleicher oder unterschiedlicher Funktion am Leben oder gehen diese Zellen in die Apoptose und werden so eliminiert?

1.2. Grundlagen des Immunsystems

Um die verwendeten immunologischen Methoden, die gewonnenen Resultate und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen zu verstehen und zu interpretieren, soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick zu den Aufgaben, den Komponenten und den Mechanismen des Immunsystems gegeben werden.

1.2.1. Aufgaben des Immunsystems

Die zentrale Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus vor Krankheitserregern. Außerdem ist das Immunsystem befähigt, transformierte Körperzellen, das heißt gealterte, infizierte oder neoplastisch veränderte Zellen, zu erkennen und zu eliminieren. Voraussetzung dafür ist die Fähigkeit gegen körperfremde Stoffe eine kontrollierte Immunantwort auslösen zu können (= Immunität), aber auch eine Immunantwort gegen körpereigene Stoffe zu hemmen (= Immuntoleranz).

1.2.2. Komponenten des Immunsystems

Um den vielfältigen Aufgaben gewachsen zu sein, verfügt das Immunsystem über zahlreiche Komponenten. Eine grundlegende Einteilung ist die Abgrenzung eines angeborenen und eines erworbenen/adaptiven Immunsystems. Parallel dazu verwendet man den Begriff der antigen-unspezifischen Immunität für den angeborenen Anteil und die Bezeichnung antigen-spezifische Immunität für den erworbenen Anteil des Immunsystems.

1.2.2.1. Unspezifische, angeborene Immunität

Unabhängig von zellulären und humoralen Bestandteilen zählt man hierzu auch chemische Abwehrfaktoren auf Haut und Schleimhaut, die ihrerseits wieder als mechanische Barriere eine erste Grenze für körperfremde Stoffe bilden.

An zellulären Bestandteilen sind hier Makrophagen, Monozyten, Mastzellen und Granulozyten zu nennen. Diese sind im Unterschied zum adaptiven Immunsystem ontogenetisch sehr alte Zellarten. Einen besonderen Platz nehmen an dieser Stelle auch die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) ein, die sich aus der lymphozytären Zelllinie entwickeln, jedoch keinen Antigen-spezifischen Rezeptor tragen und deshalb zum angeborenen Immunsystem zählen. Sie sind in der

Lage Tumorzellen, Virus-infizierte Zellen und Zellen mit intrazellulären Pathogenen zu erkennen und zu vernichten [3].

Wichtige humorale Faktoren sind das alternative Komplement-System, Akut-Phase-Proteine und einige Zytokine. Das Komplementsystem ist eine Gruppe von Proteinen, die in enzymatischen Kaskaden aktiviert werden. Ziel des Komplements ist die Opsonisierung (z.B. von Bakterien), die Bindung an Antigen-Antikörper-Komplexen, die Aktivierung und Chemoattraktion von Phagozyten und NK-Zellen, sowie die osmotische Lyse von Zielzellen über einen äußerst bioaktiven Membranangriffskomplex [3, 4].

Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Glykoproteinen, welche von einer großen Anzahl an Immun- und anderen Zellen gebildet und sezerniert werden. Über Zytokine werden andere Zellen aktiviert, zur Differenzierung angeregt oder in ihrer Zellfunktion moduliert. Hierzu gehören insbesondere: IL-1, IL-6, Tumornekrose-Faktor- α (TNF α), sowie die Interferone α und β . Zwei wichtige Ereignisse, ausgelöst durch Zytokine sind zum Beispiel die Induktion von Fieber im Hypothalamus durch IL-1 und die vermehrte Synthese von so genannten Akut-Phase-Proteinen in der Leber durch IL-6.

Ein wichtiger Unterschied zum antigen-spezifischen Immunsystem ist die Tatsache, dass es im angeborenen Anteil kein erregerspezifisches immunologisches Gedächtnis gibt, das bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Erreger einen schnelleren Aufbau von Abwehrfunktionen ermöglicht.

1.2.2.2. Antigenspezifisches, erworbenes (adaptives) Immunsystem

Analog dem angeborenen Immunsystem lässt sich auch hier eine weitere Unterteilung in zelluläre und humorale Elemente vornehmen. Die zelluläre Ebene beinhaltet den Großteil der Lymphozytenzelllinie in Form von B- und T-Lymphozyten; zur humoralen Ebene zählen Immunglobuline (Antikörper) verschiedener Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) und Zytokine (IL-2, IL-4, IL-5, Interferon- γ (IFN- γ)). Virale, mykobakterielle, intrazelluläre Erreger sowie Pilzinfektionen sind Hauptaufgabe des zellulären Anteils, wohingegen humorale Abwehrmechanismen bei bakteriellen Erregern im Vordergrund stehen [3, 4].

Damit antigen-spezifische T-Zellen ihr Antigen erkennen können und dadurch aktiviert werden, muss diesen das besagte Antigen von so genannten Antigen-präsentierenden-Zellen (APCs) dargeboten werden [3]. Zu den APCs zählen B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Langerhanszellen der Haut, Kupffer-Zellen der Leber, sowie die dendritischen Zellen des lymphatischen Gewebes.

1.2.2.3. Haupthistokompatibilitätskomplex und Antigenpräsentation

Entscheidendes Instrument der Antigenpräsentation ist das MHC-Molekül (major histocompatibility complex (MHC), auch als human leukocyte antigen (HLA) bezeichnet). Von diesem Molekül gibt es zwei Klassen, die sich bezüglich Funktion und Präsentation auf verschiedenen Zellen unterscheiden.

MHC Klasse I Moleküle werden mit Ausnahme der kernlosen Erythrozyten auf jeder kernhaltigen Zelle exprimiert. Es zeigt sich für die MHC Klasse I Moleküle ein umfangreicher genetischer Polymorphismus. Die auf diesen MHCs präsentierten Proteinfragmente sind entweder körpereigene Antigene (Immuntoleranz) oder Antigene von intrazellulären Bakterien, Viren sowie Tumorantigene [3]. Direkter Interaktionspartner ist die CD8-positive zytotoxische T-Zelle, deren T-Zellrezeptor spezifisch für die Erkennung von Antigenen zusammen mit MHC Klasse I Molekülen ist.

MHC Klasse II Moleküle zeigen im Vergleich zu MHC Klasse I Molekülen ebenfalls eine dimere Struktur, mit dem Unterschied, dass die variable Antigen-Bindungsgrube durch Anteile der α - und der β -Kette gebildet wird. Ebenfalls zeigt sich ein deutlicher genetischer Polymorphismus. MHC Klasse II Moleküle werden nur auf den in 1.2.2.2 beschriebenen APCs und zusätzlich auf Zellen des Thymusgewebes (zur T-Zell Reifung und Selektion) exprimiert. Ihre Aufgabe besteht in der Präsentation extrazellulärer, durch Phago- beziehungsweise Pinozytose aufgenommener Fragmente von Bakterien, Pilzen oder Viren an CD4 positive Zellen. In den für wissenschaftliche Experimente im Allgemeinen verwendeten Maus-Inzucht-Stämmen ist der genetische Polymorphismus der MHC-Moleküle aufgehoben - alle APCs tragen dasselbe MHC-Molekül (bei SJL-Mäusen I-A^S). Dieses spezielle MHC Molekül wurde für die Herstellung unserer MHC Klasse II Tetramere verwendet [3].

1.2.2.4. B-Lymphozyten

B-Zellen leiten sich von lymphozytären Stammzellen des Knochenmarks ab. Die antigenspezifische Erkennung wird durch den B-Zell-Rezeptor-Komplex ermöglicht. Über diesen Rezeptor ist im Gegensatz zu T-Zellen die Erkennung von Protein-Epitopen ohne Antigenprozessierung möglich. Damit nach einer Antigenerkennung über den B-Zell-Rezeptor die Aktivierung der B-Zelle erfolgt, sind weitere kostimulatorische Signale notwendig. Diese stammen zum Beispiel über CD40/CD40L Interaktionen von T-Helfer-Zellen, über zusätzliche Stimulation durch den B-Zell-Korezeptor direkt vom Antigen oder, wenn die B-Zelle selbst als APC fungiert, über Zytokinsignale von T-Helfer-Zellen. Differenziert sich die B-Zelle nach der Aktivierung zur Ak-sezernierenden Plasmazelle, so werden zunächst Ak der Klasse IgM gebildet. Um Ak anderer Klassen zu produzieren, muss es zu einem so genannten Isotyp-Switch kommen. Dieser benötigt unter anderem die Expression von CD40L durch T-Helfer-Zellen und wird durch verschiedene Zytokine gesteuert [3].

1.2.2.5. T-Lymphozyten

Da für dieses Projekt T-Zellen eine der Hauptrollen spielen, soll diese Zellpopulation etwas genauer vorgestellt werden. Als primäres lymphatisches Organ gilt der Thymus. Zellen der frühen T-Zelldifferenzierung wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein, um dort negativ und positiv selektiert zu werden. Durch Selektion sollen Lymphozyten, die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, eliminiert werden. Charakteristisch für die T-Zelle ist der T-Zell-Rezeptorkomplex; es handelt sich dabei um eine Gruppe von Molekülen auf der Zelloberfläche, die für die Antigenerkennung entscheidend ist. Im Mittelpunkt steht der T-Zellrezeptor, ein heterodimeres Molekül, aufgebaut aus einer α - und einer β -Kette (seltener aus einer γ - und δ -Kette), die mit ihren variablen Anteilen zusammen die antigenerkennende Region bilden. Gegenüberliegend finden sich Domänen, die den Rezeptor in der Zellmembran verankern.

Daneben exprimiert ein Teil der T-Zellen den Korezeptor CD4. Diese Population der CD4-positiven Zellen bezeichnet man auch als T-Helfer-Zellen. Andere T-Lymphozyten exprimieren auf der Oberfläche CD8. Diese Zellen werden als

zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Zusammen mit den erwähnten Unterschieden in der Antigenpräsentation ergibt sich somit, dass T-Helfer-Zellen mit dem Korezeptor CD4 Antigene erkennen können, die auf MHC Klasse II Molekülen präsentiert werden, wohingegen zytotoxische T-Zellen mit ihrem Korezeptor CD8 auf Antigene spezialisiert sind, die durch MHC Klasse I Molekülen angeboten werden.

Bei den CD8+ Zellen handelt sich um eine Zellpopulation, deren Aufgabe in der Lyse von Zielzellen liegt. Hierzu stehen der T-Zelle verschiedene zytotoxische Instrumente zur Verfügung; neben zellgebundenen Faktoren wie dem Molekül CD95 Ligand (siehe Apoptose 1.6) zählen hierzu Zytotoxine (Perforine, Granzyme) und verschiedene Zytokine (IFN- γ , TNF- α und TNF- β) [3].

Lange ging man davon aus, dass es sich bei CD4+ Zellen um eine homogene Population handelt. Mit zunehmenden Erkenntnissen wurde in den späten 80er Jahren jedoch klar, dass sich aufgrund von Funktion und Zelleigenschaften weitere Subpopulationen abgrenzen lassen. Das folgende Schaubild (Abb. 1) gibt einen Überblick.

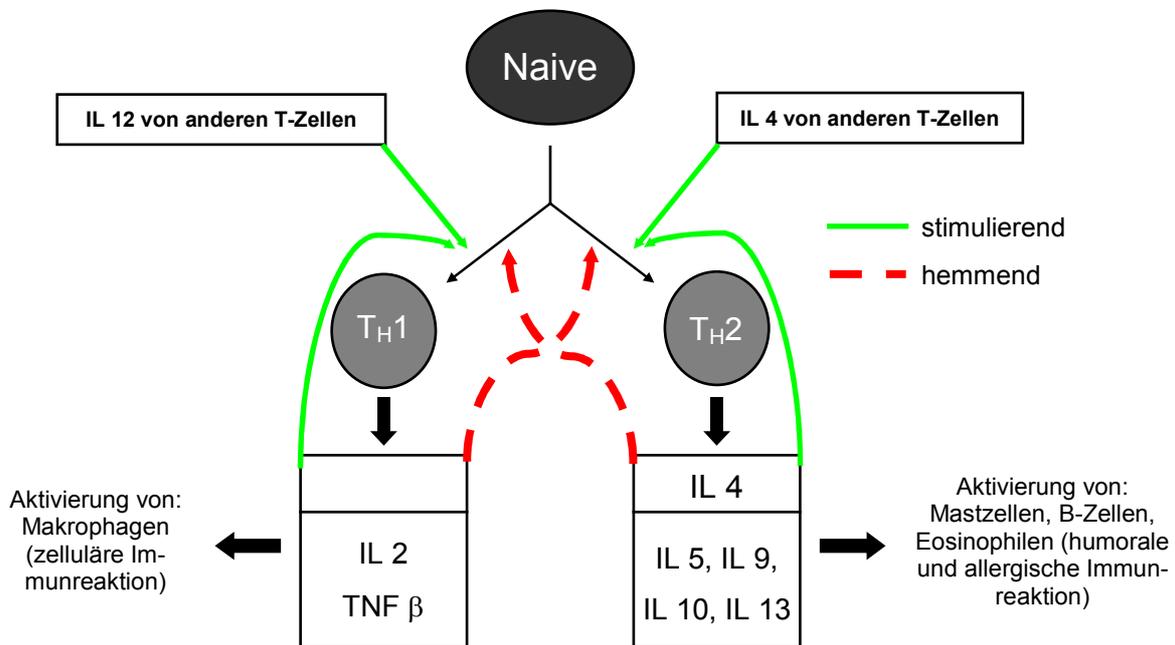


Abb. 1: T-Zell-Subpopulationen [3]

Damit eine unreife T-Zelle proliferiert und differenziert, benötigt sie verschiedene Signale. Neben der Aktivierung der T-Zelle über den T-Zellrezeptorkomplex durch das spezifische Antigen sind noch zusätzliche

Signale notwendig, für die so genannte kostimulatorische Moleküle (zum Beispiel Interaktionen von B7.1/B7.2 (CD80/CD86) auf APCs mit CD 28 oder CTLA-4 (CD152) auf T-Zellen sowie ICOS Ligand (APC) und ICOS (T-Zelle)) ausschlaggebend sind. Erst beide Signale zusammen führen zu einer Aktivierung der T-Zelle; ein kostimulatorisches Signal alleine, so nimmt man an, hat keinen Effekt auf die T-Zelle. Besteht eine alleinige Aktivierung durch den T-Zellrezeptorkomplex ohne Kostimulation, so wird die T-Zelle anerg und bildet keine Effektorfunktionen aus [3]. Über den zweiten geschilderten Mechanismus versucht man das Phänomen der Toleranzentwicklung zu erklären [5].

Erhält die unreife T-Zelle beide notwendigen Signale, so beginnt sie IL-2 zu produzieren. Dieses IL-2 wirkt zum einen auf Zellen in der unmittelbaren Umgebung (ähnlich der parakrinen Hormonwirkung), zeigt aber auch „autokrine“ Wirkung auf die sezernierende Zelle selbst. Über den IL-2-Rezeptor kommt es dann zur Stimulation der T-Zelle mit nachfolgender Proliferation und Differenzierung. Die unter IL-2 Stimulus proliferierende Zelle wird als unreife Effektor-T-Zelle (T_{H0}) bezeichnet. Von diesem Stadium ausgehend spaltet sich die Entwicklung in zwei große Subpopulationen auf. Wie in Abb. 1 gezeigt spielen nun modulatorisch wirkende Zytokine von anderen (T-) Zellen die entscheidende Rolle, ob sich eine T_{H0} -Zelle zur T_{H1} - oder T_{H2} -Zelle differenziert. Dies hat ganz entscheidenden Einfluss auf die Funktion der Zelle: T_{H1} -Zellen bewirken eine zelluläre Immunreaktion durch Aktivierung von Makrophagen, wohingegen T_{H2} -Zellen eine Aktivierung humoraler und allergischer Entzündungsreaktionen zur Folge haben.

T_{H1} Zellen produzieren neben IL-2 in erster Linie $IFN-\gamma$. T_{H2} Zellen sezernieren vor allem IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13. Diese Zytokine vermitteln nachfolgend weitere Reaktionen [3, 6, 7]. Darüber hinaus werden noch sogenannte „regulatorische T-Zellen“ differenziert. Diese Zellen beeinflussen die Aktivität der anderen T-Lymphozyten. Regulatorische T-Zellen zeigen einen $CD4+$, $CD25+$ (α -Kette des IL-2-Rezeptors) Phänotyp, sezernieren jedoch kein IL-2. 1995 wurde erstmals von Sakaguchi gezeigt, dass $CD4+CD25+$ T-Zellen andere T-Zellpopulationen hemmen können [8]. Seit dieser grundlegenden Entdeckung wurde diese Gruppe von regulatorischen Zellen weiter in ihren

Eigenschaften beschrieben: So wurde gezeigt, dass sie im Thymus positiv selektiert werden, unerwarteterweise deutliche Proliferationsfähigkeit aufweisen und sehr sensibel auf Antigenkontakt reagieren, um nur einige Eigenschaften aufzuzählen [9]. Es wurde darüber hinaus nach einem spezifischen Marker für regulatorische T-Zellen gesucht – das Molekül Foxp3, ein Transkriptionsfaktor, stellte sich als ein möglicher Marker heraus [10].

T-Lymphozyten und B-Lymphozyten haben die Fähigkeit, bei einem zweiten Kontakt mit dem selben Antigen stärker und schneller eine Immunabwehr zu generieren. Diese Eigenschaft wird immunologisches Gedächtnis („memory“) genannt. T-Gedächtniszellen zeichnen sich durch ein charakteristisches Muster an Oberflächenproteinen aus: L-Selektin (ein auch als CD62 Ligand bezeichnetes Adhäsionsmolekül) ist im Unterschied zur naiven T-Zelle meistens herunterreguliert, CD44 und LFA-1 (= CD11a/18, Molekül zur Leukozytenadhesion) wird verstärkt exprimiert und es findet ein Wechsel der CD45-Isoform von der Isoform RA (hohes Molekulargewicht) in naiven T-Zellen zu der Isoform RO (geringstes Molekulargewicht) statt [3, 11].

1.3. Multiple Sklerose

1.3.1. Allgemeines

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems, bei der es zu Markscheiden-, Axon- und Neuronenverlust kommt. Als Ursache der pathologischen Vorgänge werden zur Zeit Autoimmunprozesse angenommen, die durch gewisse erbliche Faktoren und Umwelteinflüsse beeinflusst werden können [12-14].

1.3.2. Epidemiologie

In unseren Breiten ist die MS mit eine der am häufigsten auftretenden neurologischen Erkrankungen. In der Bevölkerung Nord- und Mitteleuropas beträgt die Prävalenz 30-110 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner bei einer Inzidenz von 4-6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr [14]. Es zeigt sich interessanterweise ein Geschlechterverhältnis für Frauen gegenüber Männern von 2:1 [2]. Weitere Regionen mit hoher Prävalenz sind Russland, Südkanada,

nördliche USA, Neuseeland und Südwestaustralien [14]. Auffallend ist im Gesamtüberblick ein deutliches Nord-Süd-Gefälle mit hohem Erkrankungsrisiko im Norden Europas.

1.3.3. Klinische Symptomatologie

Die Erkrankung verläuft schubförmig oder primär oder sekundär chronisch progredient, wobei im Verlauf die neurologischen Ausfälle in Form von Lähmungen, sensorischen Störungen, Sehstörungen, Blasenstörungen und kognitiver Beeinträchtigung zunehmen. In 2/3 der Fälle manifestieren sich die Krankheitssymptome im jungen Erwachsenenalter [14].

1.3.4. Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der MS ist nur unvollständig verstanden. Verschiedene Theorien wurden in der Vergangenheit erörtert. Dabei wurden die Möglichkeit einer Slow-Virus-Infektion und die Annahme eines Autoimmungeschehens immer als sehr wahrscheinlich erachtet. Für eine Slow-Virus-Infektion sprechen Verknüpfungen in der Anamnese von MS-Patienten bezüglich Infektionen mit Herpes simplex Virus Typ 1 und Typ 2 [14]. Auch die Tatsache, dass Allgemeininfektionen durch Viren (zum Beispiel Masern) als Trigger für die MS agieren, kann die These eines infektiösen Geschehens unterstützen [2]. Allerdings lässt sich hier auch die Brücke zur MS als Autoimmunerkrankung schlagen, da durch Mechanismen des „Molekularen Mimikry“ zwischen Selbst- und Fremdprotein auch die Kreuzreaktion des Immunsystems von exogenen Antigenen aufgrund struktureller Ähnlichkeit mit körpereigenen Bestandteilen der Myelinscheiden erklärbar wären [2, 15]. Auch eine Bystander-Aktivierung von autoaggressiven T-Zellen wäre als Beginn der Erkrankung zu diskutieren [16]. Weitere Fakten, die für eine Autoimmunhypothese mit T-Helfer Lymphozyten in der zentralen Funktion sprechen, sind die morphologische Zusammensetzung der entzündlichen ZNS-Läsionen, das Ansprechen auf immunsupprimierende Therapien und tierexperimentelle Daten [17, 18].

Zwillings- und Migrationsstudien haben gezeigt, dass sowohl eine genetische Prädisposition, als auch Umweltfaktoren einen Einfluss auf die Inzidenz der Erkrankung haben. So weisen monozygote Zwillinge eine Konkordanzrate von

etwa 30% auf. Als sichere Assoziation wurden bisher lediglich die MHC Klasse II Region mit den HLA Haplotypen HLA-DRB1*1501, HLA-DRB5*0101, HLA-DQB1*0602 klassifiziert [2, 19]. Dass genau diese Haplotypen eine entscheidende Rolle spielen, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit daran, dass auf einem oder mehreren dieser MHC Klasse II Allele Peptidsequenzen an autoreaktive T-Zellen präsentiert werden, wodurch es zur Aktivierung und funktionellen Differenzierung dieser T-Zellen mit nachfolgenden Autoimmunreaktionen kommt [13].

Die ablaufenden Reaktionen beschränken sich allerdings nicht nur auf das System der T-Zellen. Vielmehr gibt es Interaktionen, Verknüpfungspunkte und Effektormechanismen im Zusammenspiel mit Makrophagen, B-Zellen, Autoantikörpern und Komplementfaktoren, woraus die Gewebszerstörung im ZNS resultiert [13].

Entsprechend den zur Induktion der EAE bei Mäusen verwendeten Peptidsequenzen nimmt man auch beim Menschen an, dass das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), das Myelin Basisprotein (MBP) und das Myelin Proteolipid Protein (PLP) zum Kreis der möglichen Autoantigene gezählt werden müssen. Es ist dagegen noch nicht bekannt, welcher Myelinbestandteil als das Hauptautoantigen beim Großteil der an MS erkrankten Patienten von entscheidender Bedeutung ist [13, 20].

Betrachtet man die Gruppe der T-Helfer-Zellen etwas genauer, so muss man sich die Frage stellen, welche Wirkung die beiden Subpopulationen T_H1 und T_H2 spielen. Viele Untersuchungen weisen darauf hin, dass T-Helfer-Zellen vom Subtyp T_H1 die entscheidende Rolle in der Initiierung der Autoimmunreaktion spielen. T_H2 -Zytokine wiederum scheinen einen positiven Einfluss auf die Reduktion der Entzündungsaktivität bei der MS zu haben [2]. Deutlich wird diese antagonistische Wirkung der beiden Subpopulationen in der Therapie mit der immunmodulatorischen Substanz Copolymer-1, die das Gleichgewicht zwischen den Populationen in Richtung T_H2 verschiebt und so eine Besserung der Erkrankung und der Beschwerden erzielt [2].

Untersuchungen zeigten, dass die autoreaktiven, ZNS-spezifischen T-Helfer-Zellen in der Lage sind, Zellen im ZNS direkt zu schädigen [21] und darüber

hinaus zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen [22-24], B-Zellen [25, 26] und Makrophagen [27] führen, die ihrerseits wieder entzündliche Schädigungen im ZNS auslösen.

1.3.5. Therapie und Prognose

Als Standardtherapie der akuten MS-Schübe gilt die intravenöse Injektion von hoch dosierten Glukokortikoiden [28, 29]. Wohl erreicht man hiermit eine Verkürzung der Schubdauer, ein Einfluss auf den weiteren Verlauf des chronischen Leidens ist aber nicht gesichert [14]. Um Einfluss auf das Langzeitgeschehen nehmen zu können, wurden in den letzten Jahren gezielt Forschungen im Bereich der Langzeit- beziehungsweise Intervalltherapie angestrebt. Obwohl hier deutliche Fortschritte, vor allem durch die Einführung immunmodulatorischer Substanzen wie zum Beispiel Interferon- β und Copolymer-1, erzielt wurden, gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keine die Krankheit zum Stillstand bringende oder heilende Therapie [12, 13].

Bei Betrachtung der Langzeitprognose leben 10 Jahre nach dem ersten Schub noch 80% der Patienten. Prognostisch ungünstige Faktoren sind ein hohes Alter bei Krankheitsbeginn, Kleinhirn- und Hirnstammsymptomatiken, rasche Progredienz und ein kurzes Intervall zwischen den ersten beiden Krankheits-schüben [14]. Vereinzelt sind auch höchst akute Verläufe beschrieben, die innerhalb weniger Wochen zum Tod geführt haben.

1.4. Experimentell autoimmune Enzephalomyelitis

Die Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die durch Immunisierung mit ZNS-Antigenen oder Transfer von aktivierten ZNS-spezifischen T-Zellen ausgelöst wird. Diese Modellerkrankung wurde 1933 erstmals beschrieben [1].

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, um in Mäusen, Ratten oder Affen eine EAE zu induzieren. Die erste Variante besteht in einer aktiven Immunisierung der Tiere mit Myelinbestandteilen, die zweite Variante nutzt den passiven Transfer von myelinspezifischen T-Zellen in den Empfängerorganismus („adoptive transfer“) [30-32].

Zur Induktion der EAE in SJL Mäusen auf aktivem Wege werden folgende Peptide mit enzephalitogenem Potential verwendet: MBP Aminosäuren 84-96 (MBP 84-96), PLP Aminosäuren 139-151 (PLP 139-151) und MOG Aminosäuren 92-106 (MOG 92-106). Zur Induktion wird der Maus das Peptid in einer Emulsion mit einem Adjuvants (CFA) s.c. gespritzt. Die Protokolle für eine vollständige Immunisierung unterscheiden sich darüber hinaus je nach verwendetem Peptid in der zusätzlichen Anwendung von Pertussistoxin. Bei dem von uns verwendeten Modell der PLP 139-151 induzierten EAE in SJL Mäusen wird 100-300ng PTX i.v. gegeben. Löst man bei SJL-Mäusen eine EAE mit MBP 84-96 aus, so erfolgt eine Immunisierung mit Peptid-CFA-Emulsion an den Tagen 0 und 7, ergänzt durch eine PTX-Gabe von jeweils 200 ng an den Tagen 0 und 2 [33]. Die weite Spanne der verwendeten PTX-Dosis leitet sich zum einen durch verschiedenen publizierte Angaben her, zum anderen zeigten unseren Versuchen, dass die Aktivität des PTX je nach verwendeter Charge deutlich schwankte. Der klinische Verlauf der Erkrankung ist von einigen Faktoren stark abhängig: Neben der verwendeten Spezies spielen der Stamm und das zur Induktion verwendete Immunogen eine entscheidende Rolle. So entwickeln sich monophasische, schubförmige oder auch chronische Verläufe der tierexperimentellen Erkrankung [34]. In unserem Fall bei Induktion mit PLP 139-151 mit 200 ng PTX i.v. ergibt sich ein schubförmiger Verlauf mit ersten Krankheitserscheinungen um Tag 10-11.

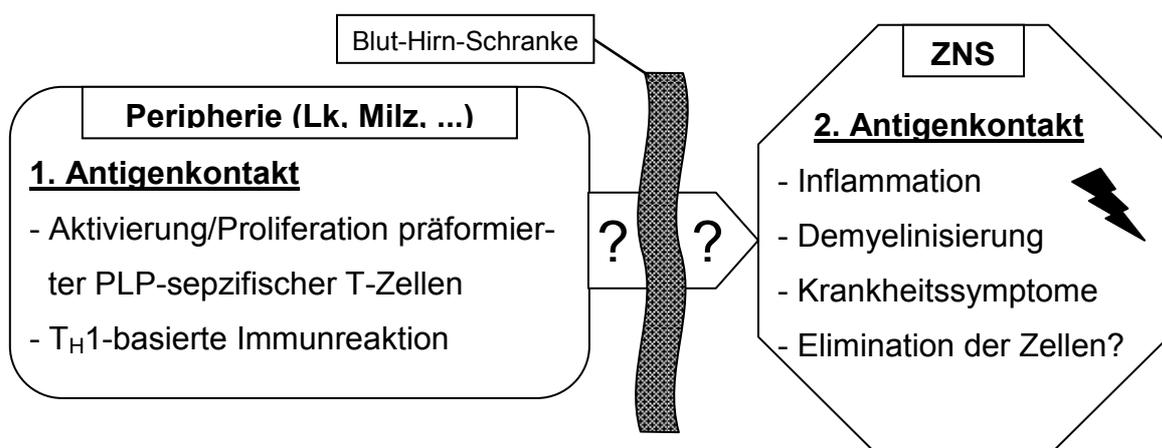


Abb. 2: Vereinfachtes Krankheitsmodell der EAE [7, 35]

Vom immunologisch/pathologischen Ablauf der PLP-EAE steht bei SJL-Mäusen die schon für nicht-immunisierte Mäusen beschriebene, erhöhte Vorläuferfrequenz PLP 139-151-spezifischer T-Helfer-Zellen im Mittelpunkt [36]. Diese Zellen haben nach Immunisierung ihren ersten Antigenkontakt und proliferieren im Sinne einer T_H1 gewichteten Immunreaktion. Wie Abb. 2 zeigt, erfolgt nach peripherer Aktivierung und Proliferation ein erneuter zweiter Antigenkontakt im ZNS. Zusammenfassend hat die EAE als breit akzeptiertes Tiermodell der MS unser Wissen über die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und die Entwicklung von neuen Therapieansätzen wesentlich beeinflusst.

1.5. Pertussistoxin

1.5.1. Herkunft, Struktur und Aufbau des PTX

Bordet und Genou entdeckten 1906 erstmals *Bordetella pertussis*, ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium, das beim Menschen das Krankheitsbild des Keuchhustens verursacht [37]. Als wichtigen Pathogenitätsfaktor produziert dieser Keim das thermolabile, nekrotisierende Exotoxin Pertussistoxin, das auch als „lymphocytosis promoting factor“ bezeichnet wird [37].

Es handelt sich um ein 105 kDa schweres Protein, das sich strukturell aus fünf Proteinketten zusammensetzt und funktionell zu den AB-Toxinen gehört. Hierbei vermittelt die B-Untereinheit die Bindung an spezifische Membranrezeptoren der Zielzelle, wohingegen die A-Untereinheit die eigentliche Wirkkomponente darstellt [37-40].

Die strukturellen Untereinheiten werden mit S_1 bis S_5 bezeichnet, wobei die funktionelle A-Untereinheit allein durch die Proteinkette S_1 gebildet wird. Die B-Untereinheit besteht jeweils aus einer Kette S_2 , S_3 und S_5 , sowie zwei Ketten S_4 .

1.5.2. Funktion und Wirkung des PTX und dessen Untereinheiten

PTX bindet über die B-Untereinheit an Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Zielzelle (als möglicher Rezeptor wird MAC-1 diskutiert [41]) und ermöglicht so eine Internalisierung der anhängenden A-Untereinheit ins Zellinnere. Die A-

Untereinheit trägt die enzymatische Funktion des PTX in Form einer NAD-abhängigen ADP-Ribosylase.

Einfluss nimmt das Toxin auf Signaltransduktionsmechanismen im Zellinneren. Zur entscheidenden Gruppe im Bezug auf PTX gehören Rezeptoren, die an das Adenylatzyklasesystem gekoppelt sind. Das Adenylatzyklasesystem setzt sich aus Rezeptoren, heterotrimeren G-Proteinen und Adenylatzyklasen zusammen. Die Adenylatzyklase, von der bis heute 8 Isoformen bekannt sind, bildet aus ATP zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), welches als einzige intrazelluläre Funktion zur selektiven Aktivierung der Proteinkinase A führt. Diese gibt durch Phosphorylierung nachfolgender Proteine Information ihrerseits weiter und nimmt so Einfluss auf die Regulation verschiedener Zellfunktionen [42]. Neben der Aktivierung der Proteinkinase A resultieren erhöhte cAMP-Spiegel auch über sogenannte „cAMP response elements“ in einer gesteigerten Transkription spezifischer Gene [42].

Wo genau beeinflusst nun PTX diesen Signaltransduktionsweg? Dazu muss man die Aufgabe der heterotrimeren G-Proteine näher betrachten. Sie bilden die Kopplung zwischen Membranrezeptor und Adenylatzyklase und nehmen direkten Einfluss auf die Aktivität dieses Enzyms. Gemeinsam ist den unterschiedlichen G-Proteinen eine heterotrimere Struktur bestehend aus einer α -, β - und γ -Untereinheit und die Tatsache, dass Guanosintriphosphat (GTP) eine wichtige Rolle spielt. Entscheidend ist hier die α -Untereinheit (G_α), die es in diesem System in zwei Formen gibt: entweder eine die Adenylatzyklase stimulierende Untereinheit $G_{\alpha s}$ oder eine inhibitorisch wirksame Untereinheit $G_{\alpha i}$. Im aktivierten Zustand ist das G-Protein mit GTP beladen und es kommt zur Dissoziation von G_α und $G_{\beta\gamma}$ (β - und γ - Untereinheiten bestehen als Dimer und haben ebenfalls intrazelluläre Funktionen). Je nach Ausprägung des G_α wird die Aktivität der Adenylatzyklase reguliert. Sobald eine GTPase (das G-Protein selbst trägt die GTPase-Aktivität) das GTP in Guanosindiphosphat (GDP) spaltet, wird das G-Protein inaktiviert und die einzelnen Untereinheiten assoziieren wieder zu einem heterotrimeren Komplex [42].

Unterschiedlich beschrieben ist nun der Wirkungsansatz von PTX bezüglich der unterschiedlichen G-Proteine. Überwiegende Meinung ist, dass die A-

Untereinheit von PTX die G_{α} -Untereinheit inhibitorischer Proteine ADP-ribosyliert, was zu deren permanenten Hemmung führt [35, 37, 42, 43]. Andere Autoren formulieren die Wirkung von PTX allgemeiner als Modifizierung von G-Proteinen, ohne auf stimulierende oder inhibitorische Wirkungen einzugehen [44]. Einleuchtender erscheint einem die selektive Hemmung inhibitorisch wirkender G-Proteine, da sich hieraus eine direkte Reaktion ergibt: Wird die Adenylatzyklase in ihrer Aktivität unter PTX-Einfluss nun weniger gehemmt, so verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung stimulierender G-Proteine, sodass in der Summe eine deutlichere Aktivierung der Adenylatzyklase mit konsekutivem Anstieg der cAMP-Konzentration resultiert.

1.5.3. Pertussistoxin und EAE

1.5.3.1. PTX als Induktor/Promotor einer EAE

PTX erleichtert die Auslösung von experimentellen Autoimmunerkrankungen wie EAE oder Experimentelle Autoimmune Orchitis. Die intravenöse Infusion von PTX ist Bestandteil der aktiven Induktion der EAE mit PLP 139-151 in SJL Mäusen. Es ist unklar, welche Mechanismen der Förderung von Autoimmunität durch PTX zu Grunde liegen. Es gibt die Hypothese, dass PTX die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke senkt und dadurch den Eintritt ZNS-spezifischer autoreaktiver Zellen ins ZNS ermöglicht. Untersuchungen zeigten, dass PTX den Durchtritt von Serumproteinen durch die Blut-Hirn-Schranke erhöht [45, 46] und dass dieser Prozess vor allem durch Histamin vermittelt wird [47, 48]. Demgegenüber steht ein ebenfalls beträchtlicher Eintritt von Serumproteinen durch die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS bei der EAE in Abwesenheit von PTX und die Tatsache, dass durch PTX-Gabe alleine keine deutlich Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke erreicht werden kann [46].

Zu den biologischen Effekten von PTX in vivo zählen gesteigerte Population von T-Zellen, intensivierete Antikörperproduktion und verstärkte Immunreaktion vom Typ IV nach Coombs/Gell [35]. In-vitro-Untersuchungen zeigten eine gesteigerte Proliferation bei gleichzeitiger Behandlung mit PTX [49] sowie gesteigerte Sekretion von T_H1 und T_H2 Zytokinen [35, 50]. Nach i.v.-Injektion von PTX steigen die Lymphozytenzahlen innerhalb weniger Stunden an und

erreichen nach 72 Stunden ein Maximum. Zusätzlich zeigten Papayannopoulou et al., dass PTX hämatopoetische Zellen aus dem Knochenmark mobilisiert [51]. Hofstetter et al. [35] berichten von einer gesteigerten Proliferation neuroantigen-spezifischer T_H1 -Zellen. Sie zeigten, dass PTX die durch Immunisierung mit Peptid in IFA ausgelösten Toleranzphänomene unterbinden kann. Darüber hinaus werden im Gegensatz zur Immunisierung mit Peptid in CFA plus PTX, wodurch eine T_H1 gewichtete Immunreaktion ausgelöst wird, bei Anwendung von Peptid in IFA plus PTX erstaunlicherweise gleichstarke T_H1 und T_H2 Reaktionen erzielt. Die T_H2 -Zellen scheinen aber die T_H1 bedingten, krankheitsinduzierenden Effekte nicht antagonisieren zu können, obwohl T_H2 -Zellen im ZNS nachgewiesen werden können.

1.5.4. Die Wirkung von PTX auf APCs.

Auch hier zeigten Hofstetter et al. [35], dass APCs durch PTX vermehrt MHC Klasse II- und kostimulatorische (CD80, CD86) Moleküle auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Eine ähnlicher Auswirkung zeigte sich bei der Untersuchung von Zellen des Rückenmarks (unter anderem Mikroglia, Astrozyten), welche ebenso MHC-Klasse II- Moleküle, CD154 und Mac-1 (ein Integrin) hochregulieren.

PTX hemmt nach Cyster et al. [52] in der Milz den Eintritt von Lymphozyten in die Follikel innerhalb der weißen Pulpa, wodurch die Zellen innerhalb der roten Milzpulpa verbleiben. Der Hypothese nach werden so mögliche periphere Toleranzmechanismen verhindert, die in den sekundären lymphatischen Organen, also der weißen Pulpa mit den Lymphfollikeln innerhalb der Milz, ablaufen.

Einfluss nimmt PTX auch auf das Apoptoseverhalten der T-Zellen [35]. Ramirez et al. [53] zeigten, dass PTX in der Lage ist, die bei Thymozyten und Prä-B-Zellen durch Aktivierung induzierte Apoptose zu unterbinden. Kamradt et al. [43] beschreiben, dass eine in BALB/c-Mäusen durch i.v.-Peptid-Injektion ausgelöste T-Zell-Anergie durch PTX verhindert werden kann.

Bemerkenswert ist, dass in transgenen Mäusen mit MBP-spezifischem T-Zell-Rezeptor die alleinige Gabe von PTX ausreicht, um eine EAE zu induzieren.

Diese Mäuse entwickeln bei Haltung unter unsterilen Bedingungen ebenfalls spontane EAE-Erkrankungen [54].

1.5.4.1. EAE-Protektion durch PTX und mögliche Aufgabenverteilung an die Untereinheiten von PTX

PTX weist sich nicht nur durch seine EAE-fördernden Eigenschaften aus; Ben-Nun et al. [55] konnten zeigen, dass PTX protektiv gegen eine EAE-Induktion wirkt, wenn man es in kleinen Mengen (5-50 ng) 30 Tage vor dem Immunisieren den Mäusen appliziert. Bei der durch PTX erzielten Protektion handelt es sich um einen Langzeiteffekt [55]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass inaktiviertes PTX zwar keine EAE-Protektion gewährleistet, aber immer noch proliferationsanregende Wirkung besitzt [56]. Bezüglich der Mechanismen, über die eine protektive Wirkung zustande kommt, lässt sich bis jetzt nur feststellen, dass die enzymatische Aktivität des Toxins erhalten sein muss [56]. Im Gegensatz zu Robinson et al. [56] schreiben Ben-Nun et al. [57] dem B-Oligomer des PTX die protektive Wirkung und der A-Untereinheit die proliferationsanregenden Eigenschaften zu.

1.5.4.2. Weitere bekannte Wirkungen von PTX

Untersuchungen, ob Chemokine und ihre zugehörigen Rezeptoren beim Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke durch autoreaktive T-Zellen eine wichtige Rolle spielen, kamen zu dem Ergebnis, dass die Chemokine CCL19 und CCL21 in von inflammatorischen Zellen umrandeten Venulen exprimiert werden [58]. Begleitet wird dies durch die Expression des zugehörigen Chemokinrezeptors CCR7 auf enzephalitogenen T-Zellen. Aufgrund der Tatsache, dass inhibitorische G-Proteine bezüglich Chemokininteraktionen eine wichtige Rolle spielen, ergibt sich bei Vorbehandlung enzephalitogener T-Zellen mit PTX als Inaktivator inhibitorisch wirkender G-Proteine ein verzögerter Beginn einer passiv induzierten EAE [58].

Arimoto et al. [59] zeigten, dass die zusätzliche Anwendung von PTX bei EAE-Induktion (MBP) in Ratten zu einer Suppression der Produktion von IL-10 führt. Da bei PTX-Gabe eine deutlich stärkere EAE mit größeren Läsion im ZNS resultierte, rechneten Arimoto et al. diesen Effekt der IL10-Reduktion zu.

Eine Vorbehandlung autoreaktiver T-Zellen mit PTX ist in der Lage, den Integrin-abhängigen Arrest der Zellen im Rahmen der Diapedese zu verhindern. Auch hier werden Signalwege vermutet, bei denen inhibitorische G-Proteine eine entscheidende Rolle spielen.[60].

Auf dem Gebiet der Alzheimer Erkrankung versuchte man durch Impfen mit β -Amyloid Peptid ($A\beta$) die Akkumulation von Amyloid im ZNS zu verhindern. Allerdings beobachtete man unerwartet bei einigen Patienten gleichzeitig eine Entzündung im ZNS. Im Tiermodell zeigte sich, dass diese Entzündung nur zustande kommt, wenn man zum Immunisierungsprotokoll PTX hinzufügt. Es ergab sich dann eine T_H1 -gesteuerte, durch $A\beta$ 1-42-spezifische T-Zellen gesteuerte Entzündungsreaktion [61]. Das Verständnis über die PTX-Wirkung in diesem Modell wäre enorm hilfreich, um neue, effektive und sichere Impfstrategien unter anderem bei der Alzheimer Erkrankung zu entwickeln.

1.6. Apoptose

1.6.1. Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose

Apoptose und Nekrose stellen für eine Körperzelle zwei Möglichkeiten des Zelltod dar. Jeder Mechanismus hat seine eigenen Auslöser, Abläufe, Regeln und Endpunkte.

Nekrose ist ein sehr ungeordneter Prozess, der im Rahmen von Verbrennungen, infektiösen Krankheiten oder auch bei ischämischen Ereignissen abläuft. Definitionsgemäß handelt es sich um die Summe der Veränderungen, die dem Zelltod in einem lebenden Gewebe beziehungsweise Organ folgen. Charakterisiert ist eine Nekrose durch Anschwellen und Vakuolisierung der Zellorganellen. Es kommt zum Zellzerfall mit konsekutivem Freiwerden von Enzymen und chemotaktischen Faktoren, die schließlich zu einer vielgestaltigen Entzündungsreaktion führen [62].

Der Organismus kann es sich allerdings nicht leisten, bei jedem Zelluntergang, insbesondere beim „physiologisch“ geplanten Zelltod, eine Entzündungsreaktion zu provozieren. Um diesem Ziel gerecht zu werden, gibt es als zweite Option den Weg Apoptose. Apoptose wird oft mit dem Begriff des „programmierten Zelltods“ übersetzt, womit der Tatsache eines geordneten, genetisch

determinierten Ablaufs Rechnung getragen wird. Ziel der Apoptose ist ein möglichst langer Erhalt der groben Zellstruktur mit Bildung von sogenannten „apoptotic bodies“, die von anderen Zellen unter Ausbleiben einer entzündlichen Reaktion phagozytiert werden [62, 63]. Innerhalb des Immunsystems spielt die Apoptose eine wichtige Rolle für Entwicklung und Funktion der Lymphozyten.

1.6.2. Mechanismen der Apoptose

Ähnlich wie viele andere Prozesse im Organismus läuft auch die Apoptose in Kaskaden sich nacheinander aktivierender Proteine ab. Der entscheidende Anfang einer solchen Kaskade kann entweder intrazellulär oder extrazellulär an der Zellmembran liegen. Betrachtet man Zellinteraktionen bei denen als Konsequenz Apoptose induziert wird, so sind vor allem zwei wichtige Rezeptorsysteme zu nennen, die für die Annahme des „Apoptoseinduktionssignals“ und für die Vermittlung in den Intrazellulärraum eine wichtige Rolle spielen: der Fas/Fas-Ligand-Pathway (CD95/CD178-Pathway), sowie der TNF- α /TNFR-1-Pathway. Beide Systeme sind für sich in der Lage, intrazellulär eine Kaskade verschiedener Caspasen zu aktivieren, welche die Informationsweitergabe in die verschiedenen Endstrecken des Apoptosemechanismus übernehmen.

Jedes System mit kaskadenartiger Aktivierung würde für sich alleine ein zu großes Risiko beinhalten völlig außer Kontrolle zu geraten. Um ein derart sensibles System sinnvoll einsetzen zu können, gibt es in Gestalt der Bcl2-Proteinfamilie eine Gruppe von pro- und antiapoptischen Molekülen, welche in modulierender Weise die Apoptosekaskade kontrollieren [64].

Eine besondere Eigenschaft der Apoptoseinduktion besteht in Form des so genannten „Activation induced cell death“. Gemeint ist die Apoptoseinduktion als Folge einer andauernden Aktivierung einer Immunzelle durch Präsentation ihres spezifischen Antigens. In diesem Zusammenhang scheint es eine wichtige Rolle zu spielen, ob neben der Präsentation des eigentlichen Antigens eine zusätzliche Aktivierung durch kostimulatorische Signale erfolgt [65, 66].

1.6.3. Methoden zum Apoptosenachweis

Entsprechend den dargestellten Apoptosemechanismen besteht heute die Möglichkeit, auf sämtlichen Ebenen der Apoptosekaskade den aktuellen Zu-

standes der Zelle aufzuzeigen. Neben der Option des direkten Nachweises aktivierter Signalproteine, wie zum Beispiel unterschiedlichen Caspasen, lassen sich apoptotische Veränderungen der Zelle selbst darstellen. Zur Verfügung stehen hierbei die Annexin V Methode mit dem Nachweis von Phosphatidylserinmolekülen auf der Außenseite der Zellmembran (weiteres unter 2.2.14) oder der „TUNEL-Assay“ mit dem Nachweis von DNA-Spaltprodukten, welche im Apoptoseprozeß durch DNA-spaltende Enzyme (DNAsen) entstehen [67].

1.7. Tetramere von MHC Klasse II / Peptid Komplexen zur direkten Darstellung spezifischer T-Helfer-Zellen innerhalb eines normalen, polyklonalen T-Zell-Repertoires

Trotz der zentralen Stellung von T-Helfer-Zellen für die Regulation von Immunantworten gab es bis vor einiger Zeit nicht die Möglichkeit, diese Gruppe von Zellen direkt zu untersuchen. Bislang konnten T-Helfer-Zellen, die gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind, nur in T-Zell-Rezeptor transgenen Tieren oder nach spezifischer Stimulation *in vitro* untersucht werden [68-70]. Diese Methoden verändern Eigenschaften und Zusammensetzung der T-Zellen und lassen nur indirekt Rückschlüsse auf die Verhältnisse in einem physiologischen T-Zell-Repertoire zu.

Vorbild für einen neuen Weg der direkten Markierung und Untersuchung war die etablierte Technik im System der zytotoxischen, CD8⁺ T-Zellen. Hier wurden mit fluoreszenz-markierten Tetrameren aus Peptid/MHC-Klasse I-Komplexen neue Möglichkeiten geschaffen [71-75]. Die Umsetzung dieser Methode für das T-Helfer-Zell-System mit Peptid/MHC-Klasse II-Komplexen bildet für uns das Instrument zur Analyse grundlegender Eigenschaften der Biologie autoreaktiver T-Helfer-Zellen bezüglich Anzahl, Lokalisation, Phänotyp und Funktion in verschiedenen Stadien der Autoimmunreaktion. Wir haben mit Tetrameren aus Peptid/MHC Klasse II Komplexen für die EAE in SJL Mäusen ein System etabliert, das es uns ermöglicht, autoreaktive T-Zellen innerhalb eines physiologischen T-Zell-Repertoires direkt *ex vivo* und *in situ* zu untersuchen [76].

1.8. Zusammenfassung der Fragestellungen dieser Arbeit

In dieser Arbeit werden die folgenden Fragestellungen bearbeitet:

1. Welche Mechanismen liegen der Induktion von Autoimmunität durch PTX zugrunde?
2. Welche Veränderungen in der Aktivierung und der phänotypischen Differenzierung autoreaktiver T-Helfer-Zellen in vivo gehen mit der Induktion einer ZNS-gerichteten Autoimmunerkrankung durch PTX einher?
3. Wie werden autoreaktive T-Zellen während der Entstehung und im Verlauf von Autoimmunität aus dem Organismus eliminiert?
4. Spielen Apoptosemechanismen autoreaktiver T-Helfer-Zellen bei der Entstehung und im Verlauf einer Autoimmunerkrankung im ZNS eine wichtige Rolle?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Tabelle der verwendeten Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
-86°C Freezer	Forma Scientific, Inc., Marietta, Ohio, USA
Auflichtmikroskop Wilovert A	Hund, Wetzlar
Computer, IBM kompatibel	Fujitsu Siemens Computers, München
Computer, Power Mac	Macintosh, Cupertino, USA
Digitalkamera AxioCam HRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Elektrische Pipette pipetus [®] -standard	Hirschmann [®] Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Eppendorf-Pipetten (diverse Volumina und Ausführungen)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
FACSCalibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
Glasspritzen mit Verbindungsstück Fortuna [®] Optima [®] 2 ml	Walter Graf u. Co. GmbH & Co., Wertheim
Kühl-/Gefrierkombination glassline	Liebherr-Holding GmbH, Biberach an der Riss
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanaus
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrotom-Kryostat Cryo-Star HM 560	Microm International GmbH, Walldorf
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG „Assistent“, Sondheim/Rhön
Pinzetten	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Schüttel-/Mischgerät, wippend, Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
Sterilarbeitsbank BioGARD Hood	the Baker Company, inc., Sanford, Maine, USA
Transferpette [®] -Pipetten (diverse Volumina und Ausführungen)	BrandTech Scientific, Inc., Essex, UK
Vortex Genie 2 TM	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wärmebad Typ 1c	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Tab. 1: Laborgeräte

2.1.2. Tabelle der verwendeten Laborverbrauchsmaterialien

Laborverbrauchsmaterial	Hersteller
15 ml Tube CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen
50 ml Tube CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well Zellkulturplatten CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen
Combitips 2,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Deckglas 24x50 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Einmal-Pasteurpipette	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Einmalspritze (diverse Volumina)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Eppendorf Cup 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Röhrchen groß, BD Falcon® 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube 352052	Becton Dickinson Labware Europe, Meylan, Frankreich
FACS-Röhrchen klein, Screenmates Poly Tubes 1.4 ml	MATRIX Technologies Corp. LTD, Wilmslow, Cheshire, UK
Feather Disposable Scalpel No. 21	Produkte für die Medizin AG, Köln
Glasgut (Bechergläser und ähnliches)	Schott/Duran, Mainz
Kanülen Sterican® (diverse Größen)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Objektträger Standard 76x26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger SuperFrost® Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen (kristall, gelb, blau)	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht
Sterilfilter Minisart® 0,2 µm	Sartorius AG, Goettingen
Stripette® 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10ml, 25 ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturflaschen 200 ml Costar®	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellsieb, BD Falcon® Cell Strainer 40 µm	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich

Tab. 2: Laborverbrauchsmaterialien

2.1.3. Tabelle kommerzieller Medien, Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Artikel	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Gibco TM, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alkohol 96 %/Alkohol 100 %	Apotheke Universitätsklinikum, Tübingen
Annexin V-FITC	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Aqua dest.	Apotheke Universitätsklinikum, Tübingen
BSA Fraktion V, pH 7.0, lyophilisiert	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CaCl ₂	Merck, Darmstadt

Material und Methoden

CFA	Difco Laboratories, Detroit, USA
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Deoxyribonuklease I (EC 3.1.21.1)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diethylether	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin gelblich	Merck, Darmstadt
EUKITT [®] Eindeckmedium	O. Kindler GmbH & Co, Freiburg
Facs Flow	Becton & Dickinson, Heidelberg
Facs Rinse	Becton & Dickinson, Heidelberg
Facs Safe	Becton & Dickinson, Heidelberg
FCS origin: South American	GibcoBRL [®] , Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Hämatoxylin kristallin	Merck, Darmstadt
Hepes Buffer Solution 1 M	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
IMDM (1x), with 25 mM HEPES, with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Immersionsöl Micorcopy	Merck, Darmstadt
KAl(SO ₄) ₂ (Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat, Kalialaun)	Merck, Darmstadt
Kollagenase (Clostridiopeptidase A; EC 4.4.24.3)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> desiccated H37RA	Difco [®] , Voigt Global Distribution LLC, Kansas City, USA
NaCl	Merck, Darmstadt
NaIO ₃ (Natriumjodat)	Merck, Darmstadt
NaN ₃ (Natriumazid)	SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg
NH ₄ Cl	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA
PBS Dulbeccos`s, w/o Calcium, w/o Magnesium, w/o Sodium bicarbonate	Gibco [™] , Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Percoll [™] (density 1,131 g/ml)	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Pertussis Toxin (Islet-activating protein)	LIST Biological Laboratories, Inc., Campbell, California, USA
Propidiumjodid, 95%	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tissue-Tek [®] O.C.T. [™] Compound Einbettmedium	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande
Trisplex [®] III (EDTA)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vectashield Mounting Medium for Fluores-	Vector Laboratories, Inc., Burlin-

cence	game, USA
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt

Tab. 3: Kommerzielle Medien, Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

2.1.4. Tabelle der verwendeten Antikörper

Antikörper (Synonym)	Klon	Fluoreszenz	Konzentration	Hersteller
CD 4 (L3T4)	GK1.5	FITC	0,5 mg/ml	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
CD 4 (L3T4)	GK1.5	PE	0,2 mg/ml	
CD 4 (L3T4)	RM4-5	APC	0,2 mg/ml	
CD 8a (Ly-2)	53-6.7	PE	0,2 mg/ml	
CD 16/CD 32 (FcγIII/II-zeptor, Mouse BD Fc Block™)	2.4G2	Unlabeled	0,5 mg/ml	
CD 25	7D4	FITC	0,5 mg/ml	
CD 44 (Pgp-1, Ly-24)	IM7	FITC	0,5 mg/ml	
CD 69 (Very early activation antigen)	H1.2F3	FITC	0,5 mg/ml	
CD 95 (Fas)	Jo2	FITC	0,5 mg/ml	
CD 154 (CD 40L, gp 39)	MR1	PE	0,2 mg/ml	
CD 178 (FasL, CD95L)	MFL3	PE	0,2 mg/ml	

Tab. 4: Kommerzielle Antikörper

2.1.5. Erythrozyten-Lyse-Puffer

(Mengenangaben gelten für 500 ml 10-fach konzentrierten Puffer)

45 g NH₄Cl (entspr. 1,6825 M)

5 g KHCO₃ (entspr. 99,9 mM)

185 mg EDTA (entspr. 0,99 mM)

→ mit Aqua dest. auf 400 ml auffüllen und mit 1M NaOH auf pH 7,3 einstellen

→ mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen, durch einen 0,2 µm Filter steril filtrieren und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahren.

Zur Verwendung wird der hergestellte Puffer im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

2.1.6. Komplettes Zellkulturmedium (cIMDM)

100 ml IMDM

10 ml FCS, inaktiviert

2 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

60 µl β-Mercaptoethanol aus einer 1:100 Verdünnung mit PBS

Man sollte das cIMDM trotz unsteriler Versuche möglichst steril halten, da es sonst relativ schnell bakteriell kontaminiert.

Es empfiehlt sich auch die β-Mercaptoethanolverdünnung (1:100) in regelmäßigen Abständen frisch anzusetzen, da sich β-Mercaptoethanol rasch zersetzt und es so zum Verklumpen der Zellen kommen kann.

2.1.7. ZNS-Verdau-Lösung

(Mengenangaben für 20 ml ZNS-Verdau-Lösung, ausreichend für 4 Mäuse)

20 ml IMDM

200 µl DNase I (aus einer 3000 U/ml-Verdünnung, entspr. 30 U/ml)

20 mg Kollagenase (entspr. 1 mg/ml)

2.1.8. Percollverdünnungen

Percoll® Dichte A (1,095 g/ml) für 4 Mäusegehirne:

10 ml Percoll®

3,68 ml PBS

Percoll® Dichte B (1,030 g/ml) für 4 Mäusegehirne:

3 ml Percoll®

10 ml IMDM

2.1.9. FACS-Puffer

(Mengenangaben gelten für 200 ml Puffer)

1 g BSA (entspr. 0,5 %)

0,04 g NaN₃ (entspr. 0,02 %)

0,067 g EDTA (entspr. 0,9 mM)

→ mit PBS auf 200 ml auffüllen

Anschließend wird der Puffer mittels 1M NaOH am pH-Meter auf pH 7,4 titriert.

2.1.10. Annexin V-binding buffer

(Mengenangaben gelten für 200 ml Puffer)

2 ml HEPES-Puffer (1 M) (entspr. 10 mM)

1,6363 g NaCl (entspr. 140 mM)

0,0735 g CaCl_2 (entspr. 2,5 mM)

→ mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen

Anschließend wird der Puffer mittels 1M NaOH am pH-Meter auf pH 7,4 titriert und zur längerfristigen Aufbewahrung, da keine konservierenden Stoffe enthalten sind, durch einem 0,2 μm Filter steril filtriert.

2.1.11. CD16/CD32 (Fc γ RIII/Fc γ RII) Antikörper-Verdünnung

Der CD16/CD32-Antikörper wird zur Verwendung 1:2500 mit FACS-Puffer verdünnt. Da pro Versuchsansatz ein Volumen von 2 μl eingesetzt wird, ergibt sich aus der Ak-Konzentration von 0,5 mg/ml (Rohlösung) eine eingesetzte Menge von 0,4 ng pro Versuchsansatz.

Nach Zugabe des Antikörpers zu 20 μl Versuchsansatz ergibt sich eine Endkonzentration von 1:25000.

2.1.12. Antikörperverdünnungen

Um mit ausreichender Genauigkeit pipettieren zu können, werden die einzelnen Antikörper im Verhältnis 1:50 mit FACS-Puffer verdünnt. Von der Antikörper-Verdünnung werden jeweils 7,5 μl pro Ansatz verwendet. Tab. 5 gibt Auskunft über die verwendete Menge an Antikörper pro Ansatz.

Antikörper	Konzentration	Eingesetzte Menge an Antikörper pro Ansatz in μg
CD 4-FITC	0,5 mg/ml	0,075
CD 4-PE	0,2 mg/ml	0,03
CD 4-APC	0,2 mg/ml	0,03
CD 44-FITC	0,5 mg/ml	0,075
CD 69-FITC	0,5 mg/ml	0,075
CD 95-FITC	0,5 mg/ml	0,075
CD 154-PE	0,2 mg/ml	0,03
CD 178-PE	0,2 mg/ml	0,03

Tab. 5: Antikörperverdünnungen

Da das Endvolumen des Färbeansatzes 50 μl beträgt, ergibt sich eine resultierende Antikörper-Verdünnung von 1:333.

2.1.13. Propidiumjodidverdünnung

Zunächst wurde eine Stammlösung von 1 mg Propidiumjodid pro ml FACS-Puffer hergestellt. Die Stammlösung wurde zur Verwendung wiederum im Verhältnis 1:100 mit FACS-Puffer verdünnt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die 5 µl der endgültigen Verdünnung, welche pro Messung eingesetzt wurden, entsprechen einer Menge von 50 ng Propidiumjodid.

2.1.14. SJL/JHanHsd – Mäuse

Die Mäuse vom Stamm SJL/JHanHsd wurden von Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen. Es handelt sich um Inzuchtmäuse, die wir zum Teil selbst im Tierstall der Kinderklinik der Universität Tübingen weitergezüchtet haben. Für unsere Versuche wurden nur weibliche Mäuse verwendet.

Aus einer Produktinformationsbroschüre (freundlicherweise von der Firma Harlan Winkelmann zur Verfügung gestellt) sind folgende Charakteristika des Stamms erwähnenswert:

- Inzuchtmaus aus der Schweiz, die aus drei verschiedenen Stämmen durch James Lambert im Jahr 1955 gezüchtet wurde
- Hohe Inzidenz (70-80%) von „reticulum cell sarcomas“ ab einem Alter von einem Jahr
- Kurze Lebenserwartung unter konventionellen Bedingungen: Weibliche 395 Tage, männliche Mäuse 472 Tage
- Möglichkeit der EAE-Induktion
- Stamm: H-2^S; MHC-Molekül: I-A^S.

2.1.15. Herstellung der Peptide PLP 139-151 und MBP 84-96

Die für die Versuche benötigten Peptide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. Hubert Kalbacher, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung wurde die γ -Fluorenylmethoxycarbonyl-Methode verwendet. Die Aufreinigung erfolgte mittels HPLC. Eine Kontrolle des Produktes erfolgte mittels Massenspektroskopie. Die Peptidsequenzen sind der Tab. 6 zu entnehmen.

PLP 139-151	HCLGKWLGHDPDKF
MBP 84-96	VVHFFKNIVTPRTP

Tab. 6: Peptidsequenzen von PLP 139-151 und MBP 84-96

2.1.16. Färbelösungen für die HE-Färbung

a) Hämalaun nach Mayer

1g Hämatoxylin kristallin wird vollständig über Nacht in 300 ml Aqua dest. aufgelöst. Nach vollständiger Lösung wird weiter zugegeben:

200 mg NaIO₃
50 g KAl(SO₄)₂
50 g Chloralhydrat
1 g Zitronensäure-Monohydrat

Lösung umrühren und über Nacht stehen lassen. Die Lösung wird über einen Faltenfilter gereinigt und anschließend mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Die besten Ergebnisse erhält man, wenn man die gebrauchsfertige Lösung noch 4-6 Wochen „reifen“ lässt.

Nach Färbung von jeweils 1000 histologischen Schnitten sollte die Lösung ausgetauscht werden.

b) Eosin

0,1 g Eosin gelblich werden in 90 %-igem Alkohol (Alkoholverdünnung mit Aqua dest.) gelöst. Zur Lösungsvermittlung und Erhöhung der Leuchtkraft wird 1 Tropfen Eisessig zugegeben.

2.2. Methoden

2.2.1. Herstellung einer Peptid-Wasser-Öl-Emulsion zur Immunisierung von Mäusen

Zur Herstellung der Emulsion werden zunächst 1,54 mg PLP-Peptid in 1 ml PBS gelöst. Als Öl-Phase wird 1 ml komplettes Freund'sches Adjuvants (CFA) verwendet, das man erhält, wenn man zu inkomplettem Freund'schem Adjuvants inaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis* in einer Konzentration von 4 mg/ml gibt. Beide Phasen werden jeweils in eine 2 ml Glasspritze aufgezogen, die über ein Zwischenstück verbunden werden. Eine optimale Emulsion erhält

man, wenn man die Wasserphase in die Ölphase spritzt und anschließend abwechselnd die Emulsion auf Eis legt und wieder gut durchmischt.

2.2.2. Immunisieren von Mäusen

Beim Immunisieren wird die Grundlage für die beiden Versuchsgruppen gelegt. Die eine Gruppe wird nach einem Standardschema immunisiert und erhält Peptidemulsion s.c. und PTX i.v., die zweite Gruppe bekommt nur Peptid-Emulsion s.c. gespritzt.

Zu Beginn der Immunisierung werden die Mäuse mittels Diethylether in einem Becherglas narkotisiert und erhalten danach unter Narkose je 50 µl PLP-Wasser-Öl-Emulsion s.c. in die Hinterläufe gespritzt. Nachdem sie aus der Kurznarkose wieder erwacht sind, werden die Mäuse der ersten Gruppe in einem Käfig mittels einer Infrarotwärmelampe aufgewärmt, damit sich die zwei venösen Blutgefäße im Mausschwanz durch Hyperämie besser darstellen. Mit einer feinen Nadel punktiert man vorsichtig eine Schwanzvene und injiziert langsam 100 µl der vorbereiteten Pertussistoxinverdünnung. In der Einleitung und im Diskussionsteil wird genauer darauf eingegangen, welche Menge an PTX den Mäusen zur Induktion gespritzt wird. Es ist darauf zu achten, dass man die Punktionsstelle nach Entfernen der Nadel sofort etwas komprimiert, um zu verhindern, dass ein Großteil des injizierten PTX wieder herausfließt.

Da es bei unserem Versuchsaufbau zum Teil zu sehr deutlichen EAE-Erkrankungen kommt, wodurch die Mäuse nicht mehr in der Lage sind, die Nahrungsbehälter am Käfigdeckel zu erreichen, wird ab Tag 10 nach Immunisierung Nahrung am Käfigboden angeboten, um zu verhindern, dass Mäuse an Nahrungs- beziehungsweise Flüssigkeitsmangel versterben und so falschen Einfluss auf die Dokumentation des Krankheitsverlaufes nehmen.

2.2.3. Festlegung des Krankheitsgrades einer Maus – Krankheitsscore

Zur Festlegung wird die allgemein übliche Einteilung [76] wie folgt verwendet:

Grad 0	keine Krankheitssymptome
Grad 1	Lähmung des Mausschwanzes <u>oder</u> Parese der Hinterläufe
Grad 2	Lähmung des Mausschwanzes <u>und</u> Parese der Hinterläufe
Grad 3	Plegie der Hinterläufe

Grad 4	Plegie der Hinterläufe, Parese der Vorderläufe
Grad 5	Tod

2.2.4. Zentrifugieren von Zell- und Organsuspensionen

Wenn in einem der nachfolgend beschriebenen Schritte Zellen beziehungsweise Organsuspensionen abzentrifugiert werden sollen, so ist, wenn nicht anders angegeben, folgendes Vorgehen anzuwenden:

Die Suspensionen werden in einer Standardzentrifuge 5 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Möglichst sollte der Innenraum der Zentrifuge auf 4-10°C gekühlt werden. Nach erfolgtem Zentrifugieren wird der Überstand vorsichtig dekantiert und verworfen.

2.2.5. Herstellung der PLP- und MBP-Tetramere

Die Herstellung der verwendeten MHC-Klasse II-Tetramere gehörte nicht direkt zu meinen Aufgaben. Dennoch möchte ich hier zum besseren Verständnis zumindest einen groben Abriss über die Art und Weise der Tetramer-Produktion, wie sie durch Bischof et al. [76] beschrieben ist, geben.

Zur Herstellung rekombinanter Peptid/MHC-Klasse II Komplexe wurde die Methode nach Kozono [77] gewählt. Hierbei ist das Peptid über eine Linker-Sequenz kovalent mit der β -Kette des MHC Moleküls verbunden (Abb. 3). Normalerweise wird eine Zusammenlagerung der α - und β -Kette durch die hydrophoben transmembranösen Abschnitte ermöglicht, was jedoch eine Sekretion der rekombinanten Proteine verhindern und die Löslichkeit der fertigen Komplexe herabsetzen würde. Aus diesem Grund wurden die hydrophoben transmembranösen Abschnitte durch Leuzin-Zipper Sequenzen ersetzt, die eine Heterodimerisierung der beiden Ketten bei erhaltener Wasserlöslichkeit ermöglichen. Zur Aufreinigung der Proteine über Nickel- oder Kobalt-Säulen wurde die α -Kette um sechs Histidine verlängert, ebenso wurde an die β -Kette eine Sequenz angehängt, die eine Biotinylierung der Komplexe durch das bakterielle Enzym BirA zulässt.

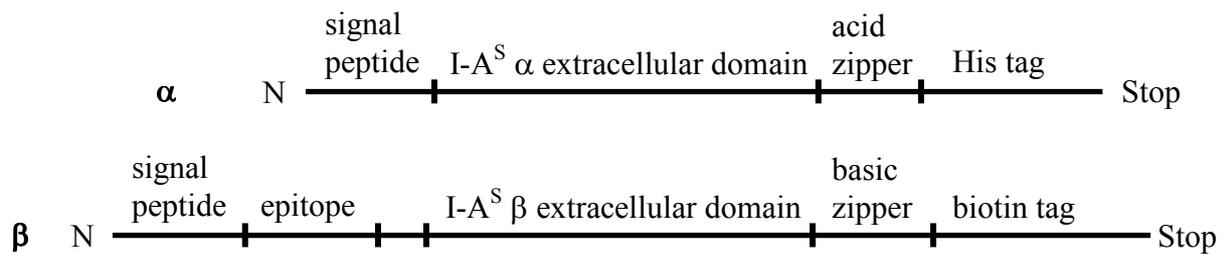


Abb. 3: Aufbau der cDNA Konstrukte zur Herstellung von Tetrameren rekombinanter Peptid/MHC Klasse II Komplexe

Nach erfolgter Biotinylierung können nun die Komplexe über fluorchrommarkiertes Streptavidin, welches vier Bindungsplätze für Biotin zur Verfügung stellt, tetramerisiert werden. Am 5'-Ende beider Ketten befinden sich Signalsequenzen zur Sekretion der exprimierten Proteine. Die Sequenz für das spezifische Peptid ist durch zwei Restriktionsschnittstellen flankiert, die einen einfachen Austausch des Epitops möglich machen. Die cDNA Konstrukte zur Tetramerproduktion für die beiden enzephalitogenen Epitope PLP 139-151 und MBP 84-96 wurden mit molekulargenetischen Methoden hergestellt und in Baculovirusstransfektoren kloniert. Rekombinante Baculoviren wurden mittels Kotransfektion und homologer Rekombination hergestellt. Nach Virusamplifikation erfolgte die Proteinexpression in Sf9 Insektenzellen. Die exprimierten Komplexe wurden aufgereinigt, mit rekombinant hergestelltem Enzym BirA biotinyliert und mit APC-markiertem Straptavidin tetramerisiert (Abb. 4).

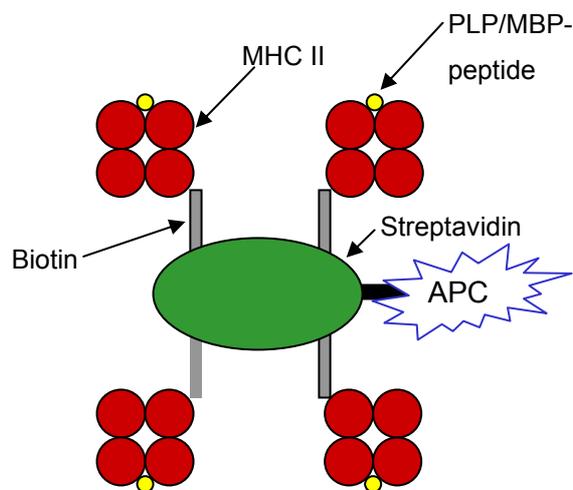


Abb. 4: Schematischer Aufbau eines fertigen Peptid/MHC Klasse II-Tetramers

2.2.6. Titration der PLP- und MBP- Tetramere

Um eine grundlegende Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsdurchgänge bei unterschiedlichen Chargen beziehungsweise Peptidspezifitäten (PLP oder MBP) der MHC-Tetramere zu gewährleisten, ist es nötig für jede einzelne Produktion eine Titration der Tetramere durchzuführen.

Je nach Verfügbarkeit von immunisierten Mäusen oder T-Zelllinien sind die folgenden Techniken möglich:

a) Färbung von DLN-Zellen einer Maus 6 Tage nach Immunisierung

Immunisieren von weibliche SJL-Mäusen mit dem gewünschten Antigen (PLP oder MBP) und PTX wie unter 2.2.2 beschrieben. Nach Gewinnung von Einzellsuspensionen des DLN 6 Tage nach Immunisierung, werden diese nach einer Titrationsreihe mit der neuen Charge T_m gefärbt. Als Referenz dient sowohl eine Färbung mit einem älteren T_m gleicher Antigen-spezifität, als auch eine Negativkontrolle mit dem T_m der jeweils anderen Spezifität. Die einzusetzende Menge des neu produzierten T_m wird so gewählt, dass sie der Affinität des älteren T_m möglichst nahe kommt.

b) Färbung von Zellen einer T-Zelllinie

Die Austestung erfolgt im Prinzip wie unter a) beschrieben, nur dass anstatt Zellen aus DLN nun Zellen einer T-Zelllinie verwendet werden. Sinnvollerweise sollte die T-Zelllinie mit dem selben Antigen stimuliert werden, auf welches auch das zu testende Tetramer spezifiziert wurde. Die T-Zelllinien werden, wie durch Bischof et al. [76] beschrieben, aus DLN-Zellen immunisierter SJL Mäuse hergestellt, die in regelmäßigen Abständen (7-14 Tage) mit Antigen und Milzzellen (als antigen-präsentierte Zellen) aus nicht immunisierten Mäusen restimuliert werden.

2.2.7. Mauspräparation

Die Maus wird direkt vor der Präparation durch CO₂ in einem Behälter getötet. Danach befestigt man die Maus auf dem Rücken liegend mittels 4 gewöhnlicher Pinwandreißnägel auf einem Korkbrett. Um zu vermeiden, dass Fellreste die entnommenen Organe kontaminieren, sprüht man die Maus mit 70% Alkohol ein, was gleichzeitig eine Verminderung der bakteriellen Kontamination zur

Folge hat. Ein steriles Präparieren ist, solange keine Langzeitzellkulturen angelegt werden, nicht notwendig.

Es erfolgt nun die Eröffnung der Haut durch einen Medianschnitt mit Y-förmiger Verlängerung in Richtung der Extremitäten. Schon jetzt erkennt man in der Poplitealregion die Lymphknoten durch Faszie und Muskeln hindurchschimmern; nur bei nicht immunisierten Mäusen kann sich das Auffinden der Popliteallymphknoten schwieriger gestalten. Mit Hilfe zweier feiner Pinzetten wird die Faszie über den Popliteallymphknoten beidseits entfernt und die umliegende Muskulatur zur Seite hin abpräpariert. Die Lymphknoten können nun vorsichtig, möglichst stumpf, herauspräpariert werden. Bevor man die Lymphknoten in 5 ml PBS aufbewahrt, sollte eventuell anliegendes Blut noch an einem Tuch abgestreift werden.

Im zweiten Schritt erfolgt die Öffnung der Bauchhöhle zur Entnahme der Milz. Mit einer anatomischen Pinzette kann man nach Einschneiden der Bauchwand das perisplenische Fett fassen und dadurch die Milz aus der Bauchhöhle luxieren. Mit einer zweiten Pinzette wird die Milz von Fett, Gefäßen und Mesenterium befreit und bis zur weiteren Aufarbeitung in 5 ml PBS aufbewahrt.

Vor der Präparation des Zentralnervensystems (ZNS) muss die Maus blutleer gemacht werden, um die Kontamination des ZNS mit peripheren Lymphozyten zu minimieren. Dazu wird der Thorax auf beiden Seiten mit der Schere von unten nach oben eingeschnitten; anschließend kann man das Thoraxschild quer durchschneiden. Mit einer 20 ml Spritze gefüllt mit PBS, versucht man nun den freiliegenden linken Herzventrikel zu punktieren und mit mittlerem Druck PBS in das arterielle System zu pressen.

Nachdem man die Präparation auf der Vorderseite abgeschlossen hat, wird die Maus nun in Bauchlage neu fixiert, um das ZNS zu präparieren. Es erfolgt die Eröffnung der Haut am Rücken in Form eines Medianschnitts vom Schwanzansatz bis zur Nasenspitze, die vorab gesondert am Präparierbrett befestigt wurde. Mit Hilfe eines scharfen Skalpells wird nun die Schädelkalotte längs inzidiert und die gesamte Wirbelsäule von der Rückenmuskulatur freigelegt. Auf einer Seite werden die Wirbelbögen mit dem Skalpell von oben nach unten scharf durchtrennt, um dann durch Umklappen der Wirbelbögen samt Dornfortsätzen

den Spinalkanal freizulegen. Mit der Schere wird der okzipitale Anteil der Schädelkalotte durchtrennt, damit man mit einer kleinen Pinzette die Kalotte nach beiden Seiten aufspreizen kann. Jetzt liegt das ZNS bestehend aus Gehirn und Rückenmark durchgehend frei. Man kann es vorsichtig mit zwei Pinzetten, nach Möglichkeit stumpf, entnehmen und in 5 ml PBS legen.

2.2.8. Isolation der Lymphozyten aus den drainierenden Lymphknoten (DLN)

Die Lymphknoten werden mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb mit 40 µm Porendurchmesser in ein 50 ml Tube gepresst und mit PBS nachgespült. Die Zellen werden abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Ist makroskopisch eine Kontamination mit Erythrozyten zu sehen, so erfolgt zunächst eine Lyse der Erythrozyten (Anleitung siehe unter 2.2.9). Ansonsten können die Zellen in 5 ml cIMDM resuspendiert und auf Eis oder in den Kühlschrank bei 4°C gestellt werden. Die Zellzahl wird nach der Anleitung unter 2.2.11 bestimmt.

2.2.9. Isolation der Lymphozyten aus der Milz

Die Milz wird mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb mit 40 µm Porendurchmesser in ein 50 ml Tube gepresst und mit PBS nachgespült. Die Zellen werden zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Um die Erythrozyten, die sich makroskopisch in reichlicher Menge im Sediment darstellen, zu lysieren, resuspendiert man die Milzzellen in 5 ml 1-fach konzentriertem Erythrozyten-Lyse-Puffer und inkubiert für 10 min. auf Eis oder bei 4°C im Kühlschrank. Danach wird wieder zentrifugiert und der nun hämolytische Überstand dekantiert. Das Zellsediment hat nun als Zeichen der erfolgreichen Lyse der Erythrozyten eine weiße Farbe. Die Zellen werden in 5 ml cIMDM resuspendiert, auf Eis oder in den Kühlschrank bei 4°C gestellt und nach der Methode unter 2.2.11 gezählt. Sollten sich Bindegewebsreste oder sonstige Verunreinigung (evtl. durch Gerinnungsvorgänge) im Tube befinden, werden diese selbstverständlich entfernt.

2.2.10. Isolation der Lymphozyten aus dem ZNS

Zunächst wird das ZNS zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, um eventuelle Blutreste am ZNS oder im Überstand zu entfernen. Dann schneidet man das ZNS

mit einem Skalpell und einer anatomischen Pinzette in einer Glaspetrischale in möglichst kleine Stücke. Es werden nun 5ml der unter 2.1.7 beschriebenen ZNS-Verdau-Lösung zum geschnittenen ZNS in ein 50 ml Tube gegeben, welches für 60 Minuten ins bewegte Wasserbad bei 37°C gestellt wird. Trotz der Rüttelfunktionsautomatik sollte man gelegentlich das Tube aufschütteln.

Nach der Inkubation im Wasserbad erscheint das ZNS nun leicht mazeriert und kann nun problemlos mit einem Spritzenstempel durch einen Zellsieb mit 40 µm Porendurchmesser gepresst werden. Zum Nachspülen wird wieder PBS verwendet. Es sollte darauf geachtet werden, dass möglichst das gesamte ZNS verwendet wird. Dies gilt nicht nur hinsichtlich der Gesamtzellzahl im ZNS, sondern auch aufgrund der Tatsache, dass sich bei einer an EAE erkrankten Maus gerade im Rückenmark viele Lymphozyten finden lassen. Die Zellsuspension wird wie bei den anderen Organen zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Es folgt nun die Erythrozytenlyse wie unter 2.2.9 für die Milz beschrieben.

Nach der Erythrozytenlyse und der dazugehörigen Zentrifugation sollte der Überstand mit einer Pipette abgenommen werden, da für die im folgenden beschriebene Dichtezentrifugation die Volumina möglichst optimal dem Protokoll angepasst werden sollten und man bei einfachem Dekantieren sehr leicht etwas Überstand bei den Zellen belässt.

Für die Percoll-Dichtezentrifugation, zum Isolieren der Lymphozyten aus der verdauten Gehirns substanz, stellt man wie unter 2.1.8 beschrieben zwei Dichtefraktion A und B her. Die „Gehirnsuspension“ wird in 3 ml der Fraktion B (geringere Dichte) gelöst und in ein 15 ml Tube vorgelegt. Oftmals kann man auch hier einen kleine Verunreinigung aus Bindegewebe oder vermutlich geronnenem Material finden, die man für optimale Ergebnisse beim Dichtegradienten entfernen sollte. Anschließend wird die vorgelegte Zellsuspension mit 3 ml der dichteren Fraktion A unterlegt. Die anschließende Zentrifugation erfolgt für 30 Minuten mit 2500 Umdrehungen pro min. bei 4°C ohne Zentrifugenbremse, um ein Vermischen der Fraktionen beim Auslaufen der Zentrifuge zu vermeiden.

Nach dem Zentrifugieren erhält man ein Ergebnis, das ungefähr wie folgt aussieht (Abb. 5):

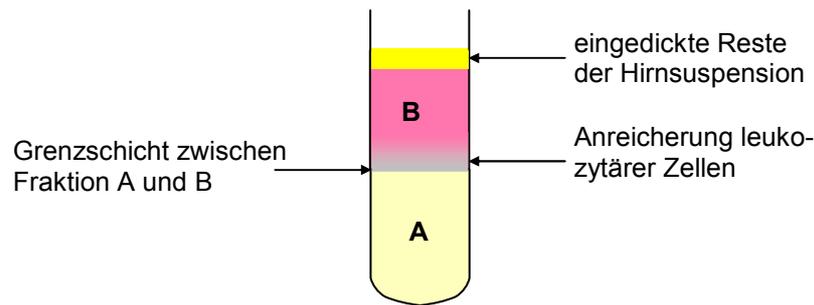


Abb. 5: Ergebnis nach Dichtezentrifugation

Durch das Zentrifugieren lagern sich die leukozytären Zellen aufgrund ihrer Masse und Dichte auf der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen ab. Die restlichen, sehr fettreichen Anteile des Mäusehirns befinden sich als etwas festere Schicht auf der Fraktion B. Man versucht nun vorsichtig mit einer Einmalpipette, am besten unter Ausblasen der restlichen Luftbläschen in der Pipette, am Rand der Fettschicht vorbeizugehen, um die Pipettenspitze wenige Millimeter über der Grenzschicht zu positionieren. Mit kreisenden Bewegungen werden nun vorsichtig die leukozytären Zellen über der Grenzschicht aufgesogen.

Die Zellen werden dann mit 5 ml IMDM in einem 15 ml Tube resuspendiert, abzentrifugiert und nochmals mit 5 ml cIMDM gewaschen. Nach dem Abgießen werden die Zellen mit 350 μ l cIMDM resuspendiert. Hier sollte mittels einer 1000 μ l-Pipette nachträglich das Volumen der Zellsuspension bestimmt werden, da nach dem vorherigen Dekantieren ca. 60-80 μ l Medium bei den Zellen verbleibt, was bei einem geringen Gesamtvolumen die Zellzahlbestimmung zu stark verfälschen würde. Die Zellen werden auf Eis oder in den Kühlschrank bei 4°C gestellt und nach der Methode unter 2.2.11 gezählt [78].

2.2.11. Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe der Neubauerzählkammer

Um die Gesamtzellzahl zu bestimmen, werden 20 μ l Zellsuspension nach gutem Mischen aus dem Tube entnommen und mit 20 μ l Trypanblau gemischt. Mit dieser Verdünnung wird nun eine Neubauerzählkammer befüllt, in der man unter dem Auflichtmikroskop 16 große Quadrate auszählt.

Die Konzentration an Zellen pro Milliliter wird nach folgender Formel berechnet:

$$c = Z \cdot f \cdot 10000 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

Hierbei steht Z für die Zellzahl in 16 großen Quadraten und f für den Verdünnungsfaktor (in diesem Fall 2). Werden große Zellzahlen erwartet, wie zum Beispiel im Fall der Milz, so empfiehlt es sich entweder nochmals mit 40 µl PBS zu verdünnen (→ Verdünnungsfaktor f = 4) oder nur 4 große Quadrate auszu zählen und die Zellzahl Z mit 4 zu multiplizieren.

Die Gesamtzellzahl erhält man dann durch Multiplikation der Konzentration c mit dem Volumen der isolierten Zellsuspension.

2.2.12. Aussäen und Färbung von Zellen mit MHC-Klasse II-Tetrameren

Für die geplante FACS-Analyse werden pro Messung 500.000 Zellen verwendet. Man entnimmt dazu aus der Zellsuspension entsprechend der Anzahl der Messungen pro Organ das aus der Zellkonzentration bestimmte Volumen, verdünnt dieses mit 2 ml cIMDM und zentrifugiert ab. Anschließend werden pro Versuchsansatz 20 µl cIMDM zugegeben und nach vorsichtigem Vortexen nach Pipettierschema pro Well 20 µl Zellsuspension in eine 96 Well Zellkulturplatte auspipettiert. Entsprechend des Pipettierschemas gibt man nun in jedes Well die in Vorversuchen (siehe 2.2.6) ermittelte Menge an PLP- beziehungsweise MBP-Tm-APC. Die Zellkulturplatte wird dann lichtgeschützt über Nacht (mindestens 8 h) bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

2.2.13. Färbung von Zellen mit Antikörpern

Am darauf folgenden Tag werden zunächst die FcγIII- und FcγII-Rezeptoren mit 2 µl eines 1:2500 verdünnten CD16/CD32 (FcγRIII/FcγRII) Antikörpers geblockt (10 min. Inkubationen bei 4°C im Kühlschrank oder auf Eis). Danach gibt man zu jedem Well 20 µl FACS-Puffer, um für die anschließende Antikörperfärbung ein Endvolumen von 50 µl zu erreichen. Dabei wird vernachlässigt, dass 3 Kontrollmessungen nur mit einer Antikörperverdünnung gefärbt werden. Direkt im Anschluss werden nach Pipettierschema jeweils 7,5 µl einer 1:50 Verdünnung der jeweiligen Antikörper zugegeben – die Färbung mit Annexin V erfolgt erst später, das entsprechende Well wird nur mit CD4-PE gefärbt. Die Inkubations-

zeit der Antikörperfärbung beträgt 15 min bei 4°C im Kühlschrank oder auf Eis (in Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) bestätigte sich, dass diese Zeit für eine vollständige Färbung ausreicht).

Abschließend werden die Zellen zweimal gewaschen, indem man mit jeweils 100 µl FACS-Puffer (Ausnahme: Annexin V Färbung, hier erfolgt Verdünnung/Waschvorgang mit 100 µl Annexin V-binding buffer) verdünnt und für 3 min. bei 1200 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert. Die Zellen werden zur FACS-Analyse in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit einer Mehrfachpipette in kleine 1,4 ml-FACS-Tubes umpipettiert.

2.2.14. Apoptosenachweis mit Annexin V

Grundlage des Apoptosenachweises mittels Annexin V ist die spezielle Anordnung der Phospholipide in der Plasmamembran der Zellen: In einer vitalen Zelle befindet sich das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) zum größten Teil im cytoplasmatischen Teil der Membran. Wird eine Zelle apoptotisch, so wird PS externalisiert und erscheint zunehmend auch auf der Außenseite der Plasmamembran. Annexin V ist ein 35-36 kD schweres Protein, das Calcium-abhängig an PS bindet. Zur Detektion mittels FACS wird an das Annexin-Protein der Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt. Um eine Unterscheidung bezüglich des Apoptosestadiums zu ermöglichen, färbt man vor der FACS-Analyse mit Propidiumjodid (PI, Strukturformel siehe Abb. 6), das durch Löcher in der Plasmamembran, wie sie bei spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen typischerweise vorkommen, eindringt und unspezifisch an DNA bindet. PI selbst hat Fluoreszenzeigenschaften und kann direkt im FACS gemessen werden.

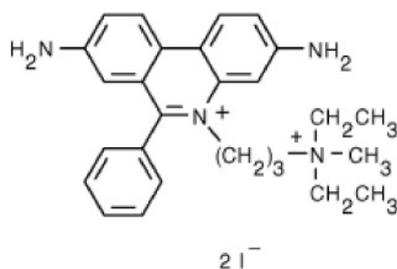


Abb. 6: Strukturformel von Propidiumjodid

Eine früh-apoptotische Zelle zeigt demnach eine Färbung mit Annexin V bei nur geringer PI-Aufnahme, wohingegen sich eine spät-apoptotische Zelle sowohl Annexin V als auch PI positiv darstellt. Die Verwendung eines speziellen Annexin V-binding buffers ergibt sich aus der oben erwähnten Ca-abhängigen Bindung von Annexin V an PS.

Ausgehend von der Produktinformation des Herstellers haben wir durch einige notwendige Abweichungen vom Herstellerprotokoll die Färbung wie folgt durchgeführt:

Als Grundlage für die Annexin V-Färbung hat man die über Nacht mit Tetrameren inkubierten Zellen mit CD4-PE-Antikörpern gefärbt und mit Annexin V-binding buffer zweimal wie unter 2.2.13 beschrieben gewaschen. Die endgültige Färbung mit Annexin V sollte nach Empfehlung des Herstellers möglichst kurz vor der FACS Messung stattfinden. Hierzu gibt man zu Zellen aus peripheren Organen (Lymphknoten, Milz) 15 μl und zu Zellen aus dem ZNS 7,5 μl einer 1:10 Verdünnung des FITC-gelabelten Annexin V-Proteins. Vorversuche zeigten, dass sich bei Verwendung von ebenfalls 15 μl Verdünnung für das ZNS eine unspezifische Färbung ergibt, die deutliche Signale im PE-Kanal aufzeigt, was eine Auswertung unmöglich macht. Die Inkubationszeit beträgt für die Annexinfärbung 15 min. bei Raumtemperatur und Lichtschutz. Der Überstand des nicht gebundenen Proteins wird nicht wie bei Antikörpern üblich abzentrifugiert, sondern man versucht nach dem Herstellerprotokoll eine zu starke Hintergrundfluoreszenz beim Messen durch Verdünnen mit 300 μl Annexin V-binding buffer zu minimieren (Anmerkung: Hier weichen wir aufgrund der Zeitersparnis beim Messen vom Protokoll des Herstellers, der 400 μl Puffer zur Verdünnung empfiehlt, ab). Nun kann die Probe nach Zugabe von 5 μl PI (Konzentration siehe 2.1.13) gemessen werden.

2.2.15. FACS-Gerät und FACS Messung

Beim FACS - fluorescence analyzed cell sorter – oder auch Durchflußzytometer genannt, handelt es sich um ein Gerät, das die Fähigkeit besitzt, für jede einzelne Zelle einer Probe, die Größe und Granularität (= Komplexität des Zellin-

haltes) sowie die Fluoreszenzintensität von einem oder mehreren eventuell gebundenen Fluoreszenz-markierten Antikörpern zu messen.

Hierzu ist es notwendig die Zellen so einzusaugen und zu bewegen, dass sie einzeln hintereinander die Messeinheit des Gerätes passieren können. Ermöglicht wird dies durch eine vibrierende Fließkammer. Wir verwendeten zur Messung ein FACSCalibur[®] Zytometer, das es ermöglicht, neben Größe und Granularität noch vier weitere Fluoreszenzen zu analysieren. Um im Vergleich zum 3-Farb-System FACSScan[®] die vierte Fluoreszenz zu messen, ist neben dem blauen Argon-Laser der Einsatz eines zweiten, roten Lasers notwendig. Trifft das Laserlicht auf die einzelne Zelle, so kommt es zum einem zur Lichtstreuung, zum anderen werden Fluoreszenzfarbstoffe zur charakteristischen Lichtemission angeregt.

Die Größe der Zelle wird über die Vorwärtsstreuung (FSC), die Granularität über die Seitwärtsstreuung (SSC) bestimmt. Über ein kompliziertes System aus umlenkenden und halbdurchlässigen Spiegeln wird der Lichtstrahl zu 4 Detektionsystemen für 4 mögliche Fluoreszenzen geleitet. In unseren Experimenten sind die 4 Kanäle stets folgendermaßen belegt: Kanal 1 = FITC, Kanal 2 = PE, Kanal 3 = PI und Kanal 4 = APC.

Einstellungen, Messungen und Datenspeicherung wurden über die Software CellQuest[®] (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) auf einem G3 Macintosh vorgenommen. Für die geplanten Messungen ist es Voraussetzung, an jedem Versuchstag die selben Grundeinstellungen am FACS-Gerät zu verwenden, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Überprüft wurde die Einstellung durch Einzelfärbungen von Milzzellen für jeden verwendeten Fluoreszenzfarbstoff an jedem Versuchstag.

Problematisch bei der Durchführung war die Tatsache, dass wir nach den Versuchsdurchgängen 1-3 aus organisatorischen Gründen das FACS-Gerät wechseln mussten. Die geringen Unterschiede in der Geräteeinstellung konnten aber in der Auswertung problemlos kompensiert und angeglichen werden.

Direkt vor der Messung wird zur Abgrenzung von nekrotischen und toten Zellen jeweils 5 μ l PI (Konzentration siehe 2.1.13) gegeben (siehe auch 2.2.14). Gemessen wird mit einer Messwertabstufung von 256 (Durchgänge 1-3) bezie-

ungsweise 1024 (Durchgänge 4-7) und einer Durchflussrate von bis zu 3000 Zellen pro Sekunde.

2.2.16. Auswertung der Daten

Um die enorme Datenmenge von über 3000 Messungen zu bewältigen, haben wir uns für das Freeware-Programm WinMDI[®] Version 2.8 von Joseph Trotter (Internetadresse: <http://facs.scripps.edu>) entschieden, welches ähnliche Möglichkeiten wie CellQuest[®] (BD Bioscience, San Jose, USA) bietet, jedoch auf Microsoft Windows[®]-Basis arbeitet.

Die Auswertung erfolgt in zwei Schritten: Im ersten Schritt steht die Bestimmung der Zellzahlen im Mittelpunkt, im zweiten Schritt die phänotypische Analyse der einzelnen Zellpopulationen.

Zu Beginn wählt man sich über eine Region (R1) im FSC-SSC-Graphen die Lymphozytenpopulation aus und grenzt somit Zellreste und andere Kontamination mit niedrigem FSC aus (Abb. 7a). Dann stellt man sich die Zellen in R1 im CD4-PI-Graphen dar und grenzt stark apoptotische und nekrotische Zellen mit starker PI-Anfärbung aus (→ Region 2 enthält die „lebenden“ Lymphozyten) (Abb. 7b). Die Zellen aus R2 stellt man sich nun im CD4-Tm-Diagramm dar. Dabei kann man zwischen einer graphischen Auflösung von 128 oder 256 (Abb. 7c/d) wählen. Da man in der Graphik die Daten als farbcodierte Dichteverteilung darstellt, hat man die Möglichkeit, einen Schwellenwert für die Intensität der einzelnen Ereignisse festzulegen; es empfiehlt sich einen Schwellenwert von 0,2 zu verwenden.

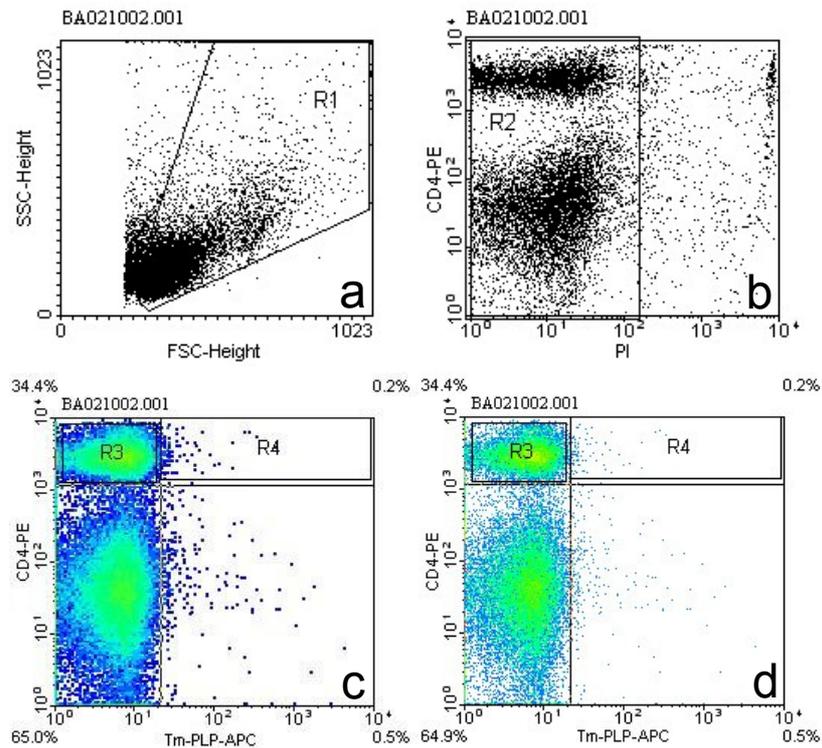


Abb. 7: Datensatz eines Lymphknoten einer Maus 6d nach Immunisierung: FSC-SSC-Diagramm (a), CD4-PI-Diagramm (b), CD4-Tm-PLP-Diagramm Auflösung 128 (c), CD4-Tm-PLP-Diagramm Auflösung 256 (d)

Um die Zellzahlen berechnen zu können gilt es, eine Grenze (x-Koordinate des „Quadranten“) zwischen Tetramer-positiven und Tetramer-negativen Zellen festzulegen, die man im Verlauf der einzelnen Durchgänge immer konstant halten sollte. Die Abgrenzung der CD4-positiven T-Helfer-Zellen (y-Koordinate des „Quadranten“) ist aufgrund von deutlich abgrenzbaren Populationen einfacher. Zur Bestimmung der x-Koordinate des verwendeten „Quadranten“ haben wir folgende Vorgehensweise gewählt: Einen ersten Anhalt für die Bestimmung der Grenze zur Tm-positiven Zellen war die Titration der einzelnen Tetramerchargen wie unter 2.2.6 beschrieben. Bei der Analyse der Daten von nicht immunisierten Mäusen zeigte sich, dass bei diesen etwa 0,5 % der CD4-positiven Zellen als Tm-PLP-positiv einzustufen waren. Deshalb wurde die Grenze einer Versuchsreihe auch immer auf die Daten von nicht immunisierten Mäusen (nicht immunisiert = d0) bezogen und darauf geachtet, dass alle Mäuse einer Versuchsreihe mit der selben Tetramercharge untersucht wurden (Abb. 8c). Als letzter Vergleichsdatensatz wurde stets auch das Kontrolltetramer Tm-MBP

verwendet, damit sich an Tag 0 in Tm-PLP- und Tm-MBP-Datensätzen ähnlich starke Zellpopulationen ergaben (Abb. 8).

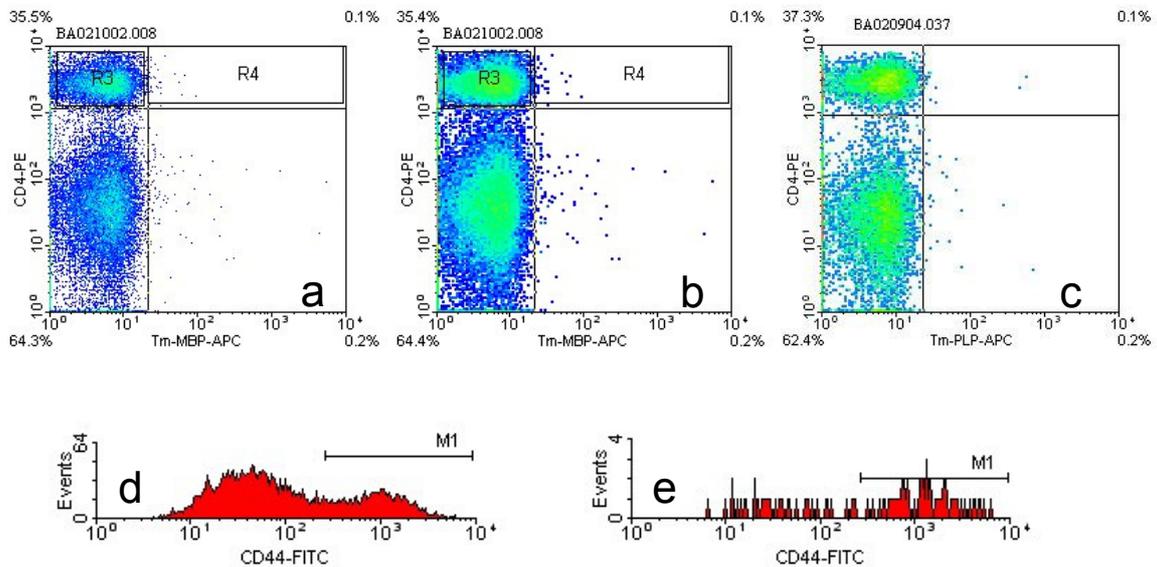


Abb. 8: Datensatz eines Lymphknotens einer Maus d6 nach Immunisierung in 256-er Auflösung (a) und 128-er Auflösung (b); Datensatz eines Lymphknotens einer nicht immunisierten Maus (d0) (c); phänotypische Auswertung spezifischer und unspezifischer Lymphknotenzellen einer Maus 6d nach Immunisierung bezüglich des Markers CD44 (d,e)

Für die Berechnung und Zusammenstellung der Daten empfiehlt sich die Tabellenkalkulation Microsoft Excel 2000[®]. Folgende grundlegende Formeln wurden zur Berechnung der Zellzahlen verwandt:

$$\text{Absolute Zellzahl: } Z_{abs} = \frac{G \cdot p \cdot Z_{Tm+/CD4+}}{Z_{Tm+/CD4+} + Z_{Tm-/CD4+}} \cdot 10$$

$$\text{Relative Zellzahl: } Z_{rel} = \frac{Z_{Tm+/CD4+}}{Z_{Tm+/CD4+} + Z_{Tm-/CD4+}} \cdot 100$$

Erklärung der Variablen:

G = Gesamtzellzahl eines Organs in Millionen (nach 2.2.11)

p = Prozentualer Anteil der CD4+ Zellen im CD4-Tm-Graphen

Z_{Tm+/CD4+} = absolute Zahl der Tm- und CD4-positiven Zellen im CD4-Tm-Graphen

Z_{Tm-/CD4+} = absolute Zahl der Tm-negativen, CD4-positiven Zellen im CD4-Tm-Graphen

Zur Zellzahlbestimmung wurden jeweils Mittelwerte aus drei Messungen errechnet, die wiederum mit den Daten zweier weiterer Versuchsdurchgänge gemittelt wurden. Die Tabellenkalkulation übernahm die Berechnung der Standardabweichung s , sowie die Erstellung der Diagramme (absolute bzw. relative Zellzahl gegenüber der Zeit nach der Immunisierung in Tagen).

Im zweiten Schritt erfolgt die phänotypische Analyse der Tm-positiven und -negativen CD4-positiven Zellen. Hierfür fasst man die beiden Populationen in die Regionen 3 und 4 ein und erstellt für jede der beiden Zellpopulationen ein Histogramm mit Bezug auf den Fluoreszenzkanal des phänotypisierenden Antikörpers (Analyse Tm-positiver Zellen in Abb. 8d, Analyse Tm-negativer Zellen in Abb. 8e). Man bedient sich nun eines oder mehrerer Marker zur Abgrenzung der sich darstellenden Populationen. In vielen Fällen (zum Beispiel CD44 oder CD69) lassen sich positive Zellen deutlich abgrenzen, bei einigen Markern (wie zum Beispiel CD95) lässt sich ein Marker erst bei Mäusen in fortgeschrittenem Krankheitsstadium mit CD95-positiven Zellen definieren. In vielen Fällen kann man Markergrenzen für die einzelnen Versuchsdurchgänge übernehmen, man sollte aber auf gelegentliche Verschiebungen aufgrund von Färbetechnik oder FACS-Gerät-Kalibrierungen achten. Die über eine Histogrammstatistik in WinMDI[®] angezeigten prozentualen Werte werden ebenfalls in Microsoft Excel 2000[®] übernommen, mit anderen Durchgängen gemittelt und mit der berechneten Standardabweichung s in Diagramme übernommen.

Die Microsoft Excel[®]-Diagramme stellen den Endpunkt der Auswertung dar, aufgrund deren nochmals Werte mit auffallend großen Standardabweichungen verifiziert und überarbeitet werden müssen. Insgesamt wurden pro Untersuchungstag und für jede der beiden Versuchsgruppen je 6 Mäuse gemessen und ausgewertet.

2.2.17. Herstellung von ZNS-Gefrierschnitten für HE-Histologie

Zur Herstellung von Gefrierschnitten an Maushirn und -rückenmark erfolgt eine ZNS-Präparation analog der Mauspräparation unter 2.2.7. Die Maus sollte vor der Entnahme des ZNS mit 20 ml PBS über den linken Herzventrikel perfundiert werden. Das Gehirn wird vom anhängenden Rückenmark abgetrennt; das Rückenmark wiederum wird in drei gleichlange Stücke unterteilt. Die Gewebestü-

cke sollten möglichst sofort mittels flüssigem Stickstoff tiefgefroren werden. Um zu verhindern, dass das Gewebe bei zu schneller Abkühlung bricht, lässt man es langsam auf einem Metallspatel, welcher ein kurzes Stück in flüssigen Stickstoff getaucht wird, „durchfrieren“. Die tiefgefrorenen Gehirne können bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt werden.

Folgende Schnitte wurden am ZNS durchgeführt:

- Horizontalschnitte von Großhirn mit Hirnstamm und Kleinhirn
- Querschnitte des Rückenmarks aus 2 verschiedenen Höhen
- Längsschnitte des Rückenmarks

Im ersten Schritt wird das Gewebe entsprechend der gewünschten Schnittrichtung auf einem Metallobjektträger bei -20°C im Kryostat mittels Tissue-Tek[®] Einbettmedium „aufgeblockt“. Zum Schneiden sollte sich das Gewebe im Block auf -20°C erwärmt haben. Der Objektträger wird in die entsprechende Halterung eingesetzt, über die das Gewebe stets auf einer Temperatur von -13°C gehalten wird. Die Temperatur des Messers sollte für optimale Ergebnisse bei -19°C liegen.

Es werden nun Schnitte mit einer Dicke von $9\ \mu\text{m}$ angefertigt, von denen man im Mittel jeden 7. bis 8. Schnitt auf einen Standard-Objektträger übernimmt. Am besten gelingt dies, wenn man mit zwei feinen Pinzetten den Schnitt etwas glatt zieht und ihn anschließend auf den bei Raumtemperatur gelagerten Objektträger übernimmt. Die Schnitte lässt man bis zur Färbung einige Minuten bei Raumtemperatur auf dem Objektträger antrocknen.

2.2.18. Herstellung von ZNS-Gefrierschnitten für die Immunfluoreszenz

Das Vorbereiten und Schneiden erfolgt analog zur HE-Histologie (siehe 2.2.17) mit folgenden Abweichungen:

- Die Schnittdicke beträgt nur $7\ \mu\text{m}$.
- Man verwendet speziell beschichtete SuperFrost[®] Plus Objektträger, um bei den aufwendigeren immunologischen Färbeprozeduren ein Ablösen des Gewebeschnittes zu verhindern.
- Die fertigen Objektträger werden bei -20°C im Kryostat oder, wenn notwendig, bis zur Färbung bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.2.19. Durchführung der Standard HE-Färbung an ZNS-Gefrierschnitten

Die Färbung eines Gewebeschnittes nach der Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgt in mehreren Schritten, die in Tab. 7 dargestellt sind:

Schritt	Lösung	Zeitdauer
1	Hämalaun nach Mayer	5 Minuten
2	fließendes Leitungswasser	mindestens 5 Minuten
3	Eosin	zwischen 5 und 15 Sekunden
4	Alkohol 96 %	10 Sekunden
5	Alkohol 96 %	10 Sekunden
7	Alkohol 100 %	10 Sekunden
8	Alkohol 100 %	5 Minuten
9	Xylol 100 %	5 Minuten
10	Xylol 100 %	5 Minuten
11	Xylol 100 %	5 Minuten

Tab. 7: Färbeprotokoll für HE-Histologie

Nach jedem Lösungsbad sollte man das Gestell mit den Objektträgern gut abtropfen lassen, um die überschüssigen Farbstoffe gut auszuwaschen. Die variable Einwirkzeit für den Farbstoff Eosin ergibt sich aus der Intensität des verwendeten Lösungsansatzes, welche mit der Zeit deutlich abnehmen kann.

Nach dem letzten Schritt erfolgt das Eindeckeln der Objektträger mit Deckgläsern. Am besten gelingt dies, wenn man die Schnitte in noch Xylol-feuchtem Zustand verarbeitet, da sich nur dann das Eindeckmedium optimal zwischen Deckglas und Objektträger verteilen lässt. Dazu gibt man auf ein Deckglas einen dünnen Strich des Eindeckmediums Eukitt[®] und legt dieses anschließend vorsichtig auf den Objektträger. Mit Zellstoff wird das Deckglas vorsichtig angepresst, wodurch gleichzeitig überstehende Reste des Eindeckmediums sofort entfernt werden. Wichtig ist es, dann mit einer flachen stumpfen Pinzette durch leichtes Streichen über das Deckglas die darunter verbliebenen Luftbläschen zu entfernen, um im Mikroskop ein optimales Bild des Gewebeschnittes zu erreichen.

Nach erfolgtem Eindeckeln sollten die Objektträger vor dem Mikroskopieren am besten über Nacht trocknen, um ein Verschieben des Deckglases auf dem Schnitt zu verhindern.

Schnitte können nun innerhalb einer Woche begutachtet und, wie unter 2.2.23 beschrieben, fotografiert werden.

2.2.21. Liste der Färbeprotokolle besonderer Immunfluoreszenzfärbungen

Färbung	Protokoll
MOMA	Aceton bei -20°C 10 min → Lufttrocknen 20 min → Schweineserum 1% (Block) 10 min → MOMA-rat anti-mouse (1:40) 40 min → Waschen 2 x 5 min mit Puffer → anti-rat Fab-Cy3 (1:250) 30 min → Waschen 2 x 5 min mit Puffer → Rattenserum 1% (Block) 10 min → CD4-rat anti-mouse-FITC 30 min → Waschen 2 x 5 min mit Puffer
Neurofilament	Aceton bei -20°C 10 min → Lufttrocknen 20 min → Schweineserum 1% (Block) 10 min → Anti-Neurofilament-IgG 30 min. → Waschen 2 x 5 min mit Puffer → Sekundärrantikörper Cy3-labeled 30 min. → Waschen 2 x 5 min mit Puffer

Tab. 8: Färbeprotokolle für Immunfluoreszenz an ZNS-Schnitten

2.2.22. Mikroskopie und Digitalisierung von HE-gefärbten ZNS-Gefrierschnitten

Die fertigen Schnitte werden mit einem Mikroskop des Typs Axioplan 2, welches ebenfalls die Möglichkeit der Fluoreszenzmikroskopie bietet, durchgemustert. Interessante Befunde sowie zugehörige Kontrollen der einzelnen Versuchsgruppen werden dann über die am Mikroskop installierte Digitalkamera AxioCam HRc fotografiert (Auflösung 1300x1300 Pixel) und über das zum Mikroskop gehörende Steuer- und Bildbearbeitungsprogramm AxioVision (Version 3.1.2.1., Carl Zeiss Vision GmbH, Oberkochen) archiviert. Die Firma Zeiss liefert als Freeware die vereinfachten Bildbetrachtungssoftware AxioVision Viewer 3.0, mit Hilfe derer man die Bilder am Heim-PC betrachten, bezüglich Helligkeit und Kontrast nachbearbeiten und gegebenenfalls in andere Dateiformate konvertieren kann.

2.2.23. Mikroskopie und Digitalisierung von Immunfluoreszenz-gefärbten ZNS-Gefrierschnitten

Optimal eignen sich zur Immunfluoreszenz an Kryoschnitten die Fluoreszenzfarbstoffe DAPI, FITC und Cy-3. Zur Verfügung standen nur FITC- und PE-markierte Antikörper, weshalb es notwendig war, die PE-Fluoreszenz im Cy-3 Kanal zu messen. Beachtet werden muss, dass PE deutlich instabiler ist und schneller ausbleicht, was durch ein zügiges Arbeiten kompensiert werden kann. Die Schnitte wurden ebenfalls am Mikroskop des Typs AxioPlan 2 unter Verwendung des jeweiligen Fluoreszenzfilters ausgewertet und repräsentative Ausschnitte wurden mit dem Steuer- und Bildbearbeitungsprogramm AxioVision (Version 3.1.2.1.) mittels Digitalkamera AxioCam HRc archiviert.

Die Freeware AxioVision Viewer 3.0 (aktuelle Version AxioVision LE Revision 4.3) bietet die Möglichkeit der Veränderung von Helligkeit, Kontrast und Gamma-Korrektur. Die dargestellten Bilder wurden bezüglich der genannten Parameter nachbearbeitet, wobei folgende Kriterien im Vordergrund standen: Angleichung der Signalstärke der verwendeten Fluoreszenzen, Verringerung der Hintergrundfluoreszenz und eine optimale Balance von Kontrast und Detailgenauigkeit.

3. Ergebnisse

3.1. Krankheitsverläufe der EAE innerhalb der Versuchsgruppen

Grundlage für alle weiterführenden Versuche bildet die Untersuchung der Krankheitsverläufe beider Versuchsgruppen. Eine Gruppe von SJL-Mäusen wurde dazu mit PLP 139-151 in CFA s.c. plus PTX i.v. immunisiert, was einer regelgerechten EAE-Induktion für diesen Mäusestamm entspricht, die zweite Versuchsgruppe erhielt eine Immunisierung mit PLP 139-151 in CFA s.c., jedoch ohne die zusätzliche Gabe von PTX i.v.. Anschließend wurde an jedem Tag nach Immunisierung der Krankheitsstatus dokumentiert. Abb. 9 zeigt für die Gruppe mit PTX-Injektion kumulative Daten aus der Arbeitsgruppe. Die größere Fülle an Daten soll den Charakter der EAE nach dem „remitting-relaps-Modell“ besser darstellen. Im Schaubild (Abb. 9) ist jeweils der Mittelwert des Krankheitsgrades gegenüber der Zeit aufgetragen; als Fehlerindikator des Krankheitsgrades dient der „standard error of the mean“ (SEM).

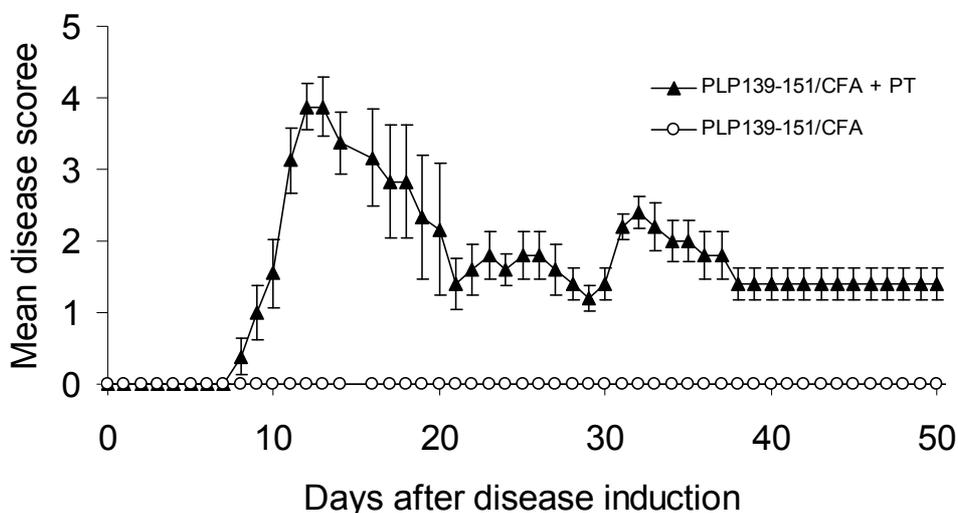


Abb. 9: Diagramm zeigt die mittlere Krankheitsausprägung (MDS) in den beiden Versuchsgruppen über 50 Tage nach Immunisierung

Auffallend ist sofort, dass die Mäuse ohne PTX-Injektion keine Krankheitssymptome aufweisen und somit vom klinischen Aspekt her für die von uns betrachtete Zeitspanne von bis zu 50 Tagen als gesund gelten.

Hingegen zeigen Mäuse mit PTX-Injektion eine zum Teil sehr ausgeprägte EAE mit einem Krankheitsbeginn um Tag 8-10 und einem ersten Krankheitshöhepunkt an den Tagen 12 und 13 mit einem MDS von 3,9 (SEM 0,33/0,41). Wie erwartet erholen sich diese Mäuse dann bis zum Tag 21 deutlich vom ersten Krankheitsschub (MDS 1,4 SEM 0,36), um dann im weiteren Verlauf erneute Krankheitsschübe mit Höhepunkten an den Tagen 25/26 und 32 zu zeigen. Die Krankheitsschübe zwei und drei weisen im Vergleich zum ersten kein so enormes Ausmaß auf, meistens besteht ein erneuter Schub in einer MDS-Veränderung von ungefähr +1.

Da wir aufgrund der Menge an EAE-Induktionen auf unterschiedliche Chargen an PTX zurückgreifen mussten, bemerkten wir, dass nicht für jede PTX-Charge dieselbe Menge an PTX ausreichte, um vergleichbare EAE-Induktionen zu erzielen. Beim Vergleich der Herstellerinformation der einzelnen Chargen fiel auf, dass sich diese in Bezug auf die Enzymaktivitäten der A-Untereinheit zum Teil auffallend unterscheiden. Um dieser Problematik gerecht zu werden, wurde jede neue Charge PTX durch Titration im Rahmen einer EAE-Induktion getestet, sodass am Ende vergleichbare Krankheitsverläufe erzielt wurden. Die verwendete Dosis an PTX lag bei unseren Versuchen im Bereich von 50-300 ng pro Maus.

Der klinische Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen war Anlass für weitere Untersuchungen dieser Mäuse und daraus folgend vor allem für die Wirkung von PTX innerhalb des Immunsystems der Maus, da die zusätzliche Anwendung dieses bakteriellen Toxins den einzigen Unterschied im Umgang mit den beiden Versuchsgruppen darstellt.

3.2. HE-Histologie von Kleinhirn und Rückenmark

Im Anschluss an die klinische Beobachtung der beiden Gruppen interessierte vor allem das histologische Korrelat zur Krankheitsausprägung. Dazu wurden von Kleinhirn (mit anhängendem Groß- und Stammhirn) und Rückenmark HE-gefärbte Histologie angefertigt, um die bei einer entzündlichen Gehirnerkrankung erwartete lymphozytäre Infiltration mit der Bildung von größeren plaqueähnlichen Läsionen nachzuweisen.

Als Negativkontrolle wurde Histologie einer gesunden, nicht immunisierten Maus angefertigt und zum Vergleich herangezogen. Dadurch soll gewährleistet sein, dass auch eine geringgradige Infiltration bei „PTX-negativen“ Mäusen erkannt wird. Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte semiquantitativ. Es bewährte sich eine Unterteilung in 5 Graden [35]:

Grad 0	keine Entzündungszeichen
Grad 1	wenige mononukleäre Zellen
Grad 2	organisierte entzündliche Infiltration um Gefäße
Grad 3	ausgeprägte Infiltration um Gefäße mit mäßiger Invasion des Subarachnoidalraums
Grad 4	ausgeprägte Infiltration um Gefäße mit starker Invasion des Subarachnoidalraums

3.2.1. Histologische Untersuchung von gesunden, naiven Mäusen als Negativkontrolle

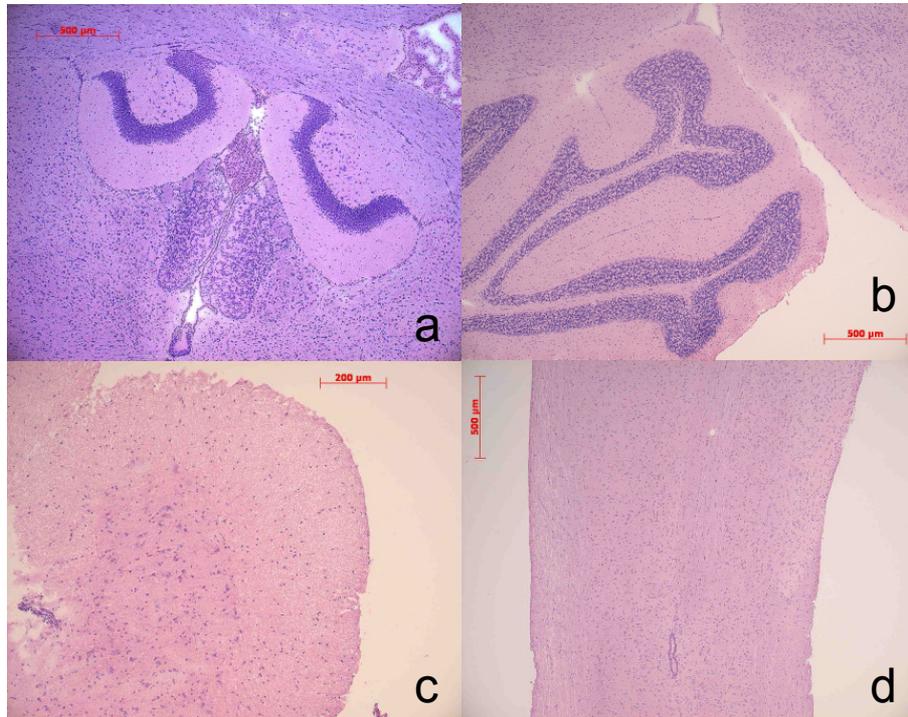


Abb. 10: HE-Histologie von nicht immunisierten Mäusen (d0) aus folgenden Bereichen: Kleinhirn (a und b, Maßstab = 500 µm), Rückenmark zervikaler Querschnitt (c, Maßstab = 200 µm), Rückenmark thorakaler Längsschnitt (d, Maßstab = 500 µm)

Abb. 10 zeigt Ausschnitte aus der Region des IV. Ventrikels (10a), einer Kleinhirnhemisphäre (10b), des zervikalen Rückenmarks (10c, Querschnitt) und dem thorakalen Rückenmark (10d, Längsschnitt). Die gezeigten histologischen Schnitte zeigen repräsentativ, dass keine entzündliche Reaktion in Form von Invasion inflammatorischer Zellen zu finden ist; dies entsprechend den Erwartungen für gesunde Mäuse vor Immunisierung.

3.2.2. Histologische Untersuchung von immunisierten Mäusen mit Pertussis-toxininjektion

Nachdem in unseren Versuchen Mäuse mit PTX-Injektion deutliche Krankheitszeichen aufwiesen, erwarten wir bei dieser Versuchsgruppe deutliche Zeichen einer entzündlichen Reaktion im ZNS. Die folgenden Abbildungen zeigen charakteristische histologische Schnitte erkrankter Mäuse 14 Tage nach Immunisierung mit PTX-Gabe.

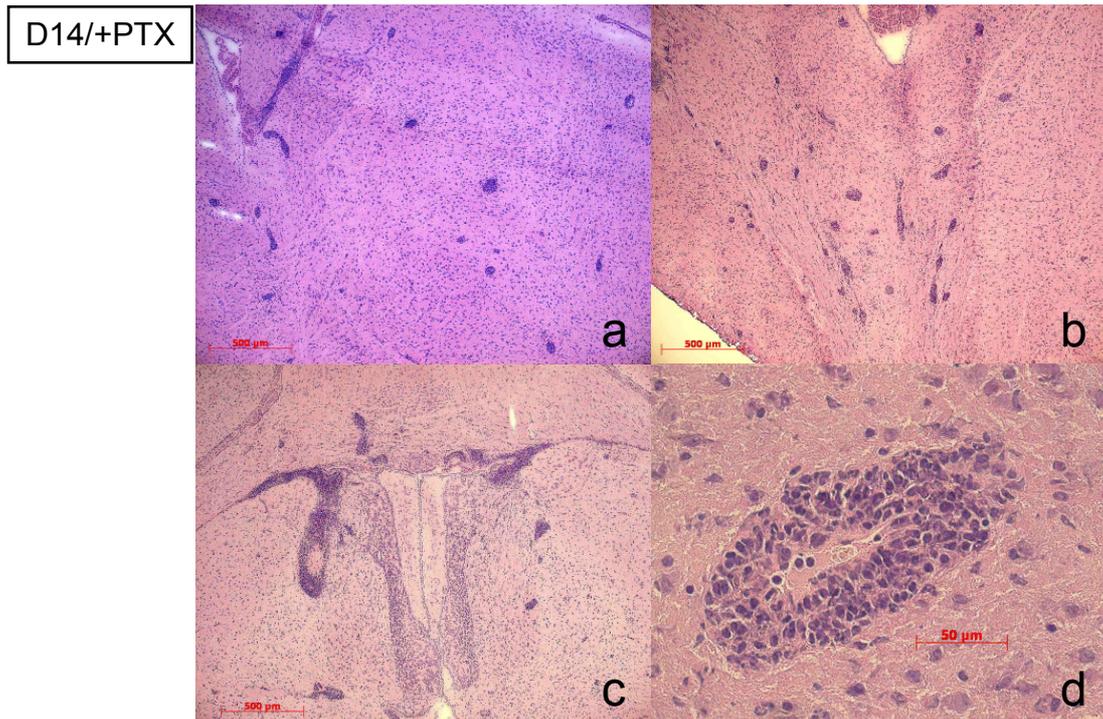


Abb. 11: HE-Histologie von immunisierten Mäusen mit PTX-Gabe (d14) aus folgenden Bereichen: Hirnstamm (a und b, Maßstab = 500 µm), zentrales Großhirn(c, Maßstab = 500 µm), Hirnstamm (d, Maßstab = 50 µm)

Abb. 11 a und b zeigen Übersichten des Hirnstamms von zwei Mäusen mit den klinischen Scores 2 und 3, welche multiple fokale Läsionen aufweisen. Vor allem in Abb. 11 b sieht man andeutungsweise, dass die inflammatorischen Bereiche längsgezogene Ausläufer ähnlich den Gefäßverläufen aufweisen. Abb. 11 c veranschaulicht, wie sich die Entzündungsreaktion tropfenförmig ins Nervengewebe ausbreitet. Abb. 11 d, eine 40-fache Vergrößerung einer Hirnstammläsion, zeigt, dass es sich gehäuft um perivaskuläre Infiltrationen handelt. Inmitten des Kreises von Entzündungszellen vermag man ein Gefäßlumen mit vier mononukleären Zellen und einem kleinen Paket zusammengeballter Erythrozyten zu erkennen.

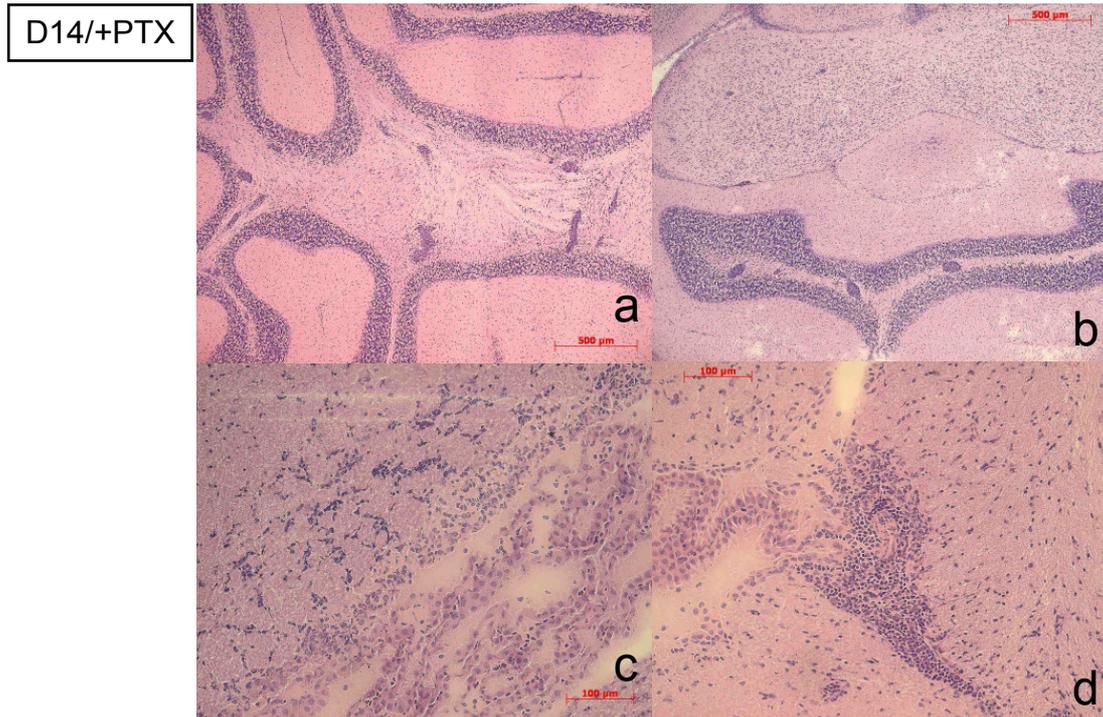


Abb. 12: HE-Histologie von immunisierten Mäusen mit PTX-Gabe (d14) aus folgenden Bereichen: Kleinhirn/-stil (a und b, Maßstab = 500 µm), Großhirn periventrikulär (c und d, Maßstab = 100 µm)

Ergänzend zeigen Abb. 12 a und b ebenfalls von PTX-immunisierten Mäusen mit Krankheitsscore 2 und 3 Kleinhirnübersichten mit Entzündungsarealen vor allem in medullären Kleinhirnabschnitten. Die Abb. 12 c und d lassen erkennen, dass sich die Entzündungsreaktion auch periventriculär im Bereich der Plexus choroidei analog einer subarachnoidalen Entzündungsreaktion ausbreitet.

In Abb. 13 bestätigen sich in Längs- und Querschnitten des Rückenmarks nochmals die Charakteristika der Entzündung in Form von multiplen Läsionen, periventriculärer sowie subarachnoidaler Inflammationsreaktion.

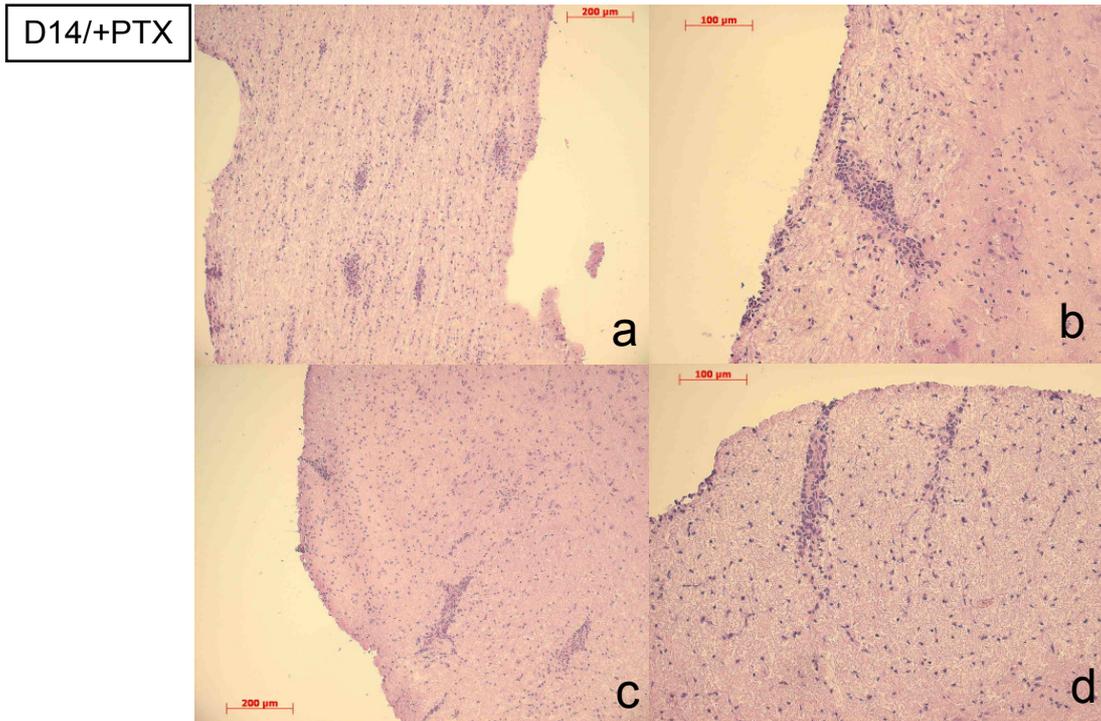


Abb. 13: HE-Histologie von immunisierten Mäusen mit PTX-Gabe (d14) aus folgenden Bereichen: Distales Rückenmark Längsschnitt (a, Maßstab = 200 µm), distales Rückenmark Längsschnitt (b, Maßstab = 100 µm), proximales Rückenmark Querschnitt (c, Maßstab = 200 µm), proximales Rückenmark Querschnitt (d, Maßstab = 100 µm)

3.2.3. Histologische Untersuchung von immunisierten Mäusen ohne Pertussis toxininjektion

Im Folgenden soll histologisch untersucht werden, ob sich bei immunisierten Mäusen ohne Pertussisinjektion trotz fehlender Krankheitssymptome Unterschiede zu gesunden Mäusen in der ZNS-Morphologie finden lassen. Auch hierzu werden nachstehend histologische Schnitte von Mäusen 14 Tage nach Immunisierung ohne PTX gezeigt:

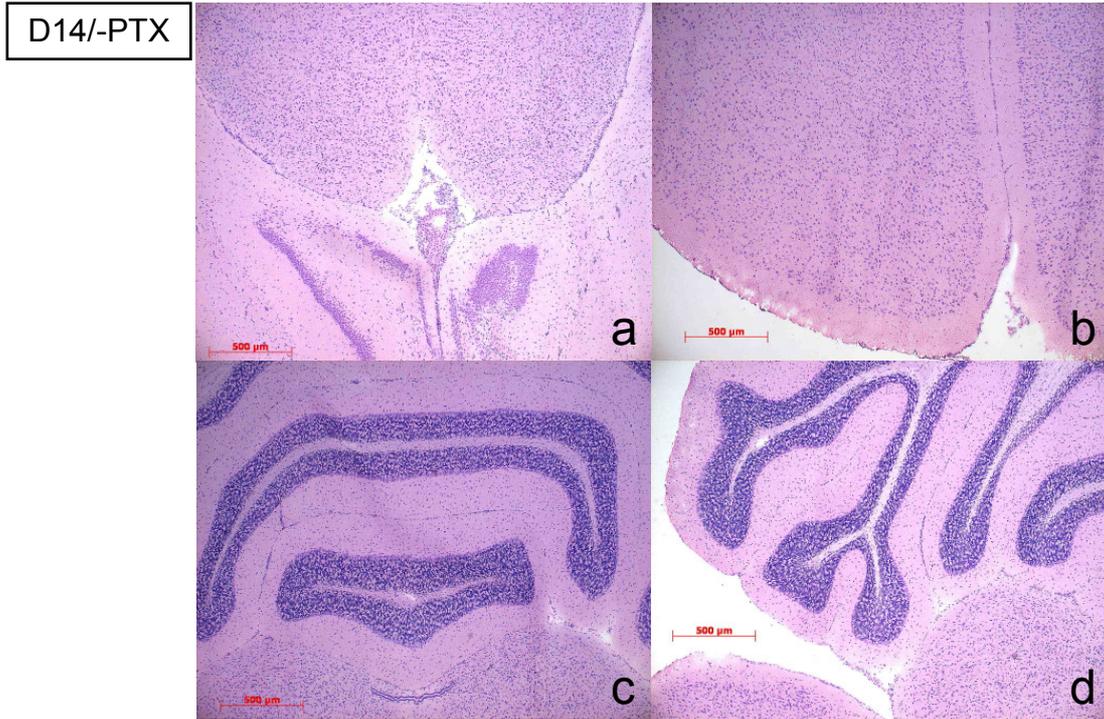


Abb. 14: HE-Histologie von immunisierten Mäusen ohne PTX-Gabe (d14) aus folgenden Bereichen (Maßstab = 500 µm) : Hirnstamm zentral (a), Frontalhirn (b), Kleinhirn mit Anschnitten von Hirnstamm und Kleinhirnstiel (c und d)

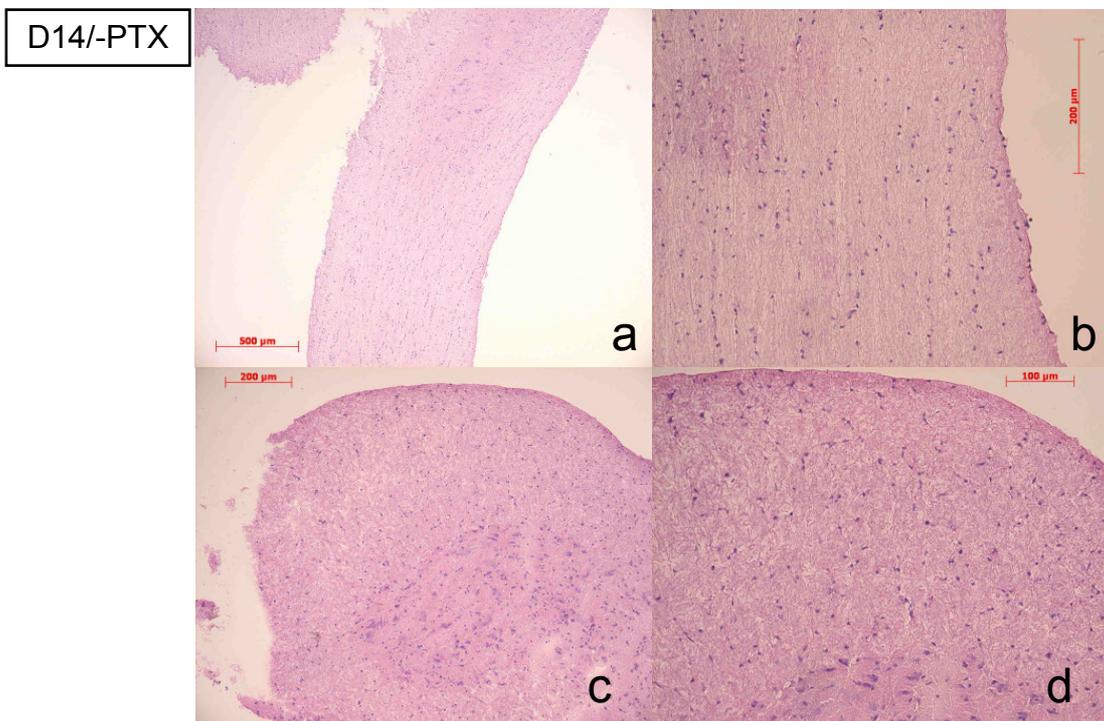


Abb. 15: HE-Histologie von immunisierten Mäusen ohne PTX-Gabe (d14) aus folgenden Bereichen: Proximales Rückenmark längs (a, Maßstab = 500 µm), Rückenmark längs (b, Maßstab = 200 µm), Rückenmark quer (c, Maßstab = 200 µm), Rückenmark quer (c, 100 µm)

In den Histologien von Groß- und Kleinhirn (Abb. 14) sowie von diversen Bereichen des Rückenmarks (Abb. 15) ließen sich keine entzündlichen Zellformationen oder andere Zeichen inflammatorischen Geschehens nachweisen.

3.3. Gesamtzellzahlen in den einzelnen Organen

Im nächsten Schritt wurde den Mäusen der beiden Gruppen an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 20 nach Immunisierung die drainierenden Lymphknoten aus den beiden Poplitealregionen, die Milz und das Gehirn mit anhängendem Rückenmark entnommen, um über die darin enthaltenen lymphatischen Zellen weitere Aussagen machen zu können.

Zunächst soll an dieser Stelle auf den einfachsten Parameter dieser Organe, die Gesamtzellzahl an Lymphozyten, ein detaillierterer Blick geworfen werden. In Abb. 16 sind die in den folgenden Abschnitten besprochenen Gesamtzellzahlen des jeweiligen Organs im Bezug zum Zeitpunkt nach Immunisierung dargestellt.

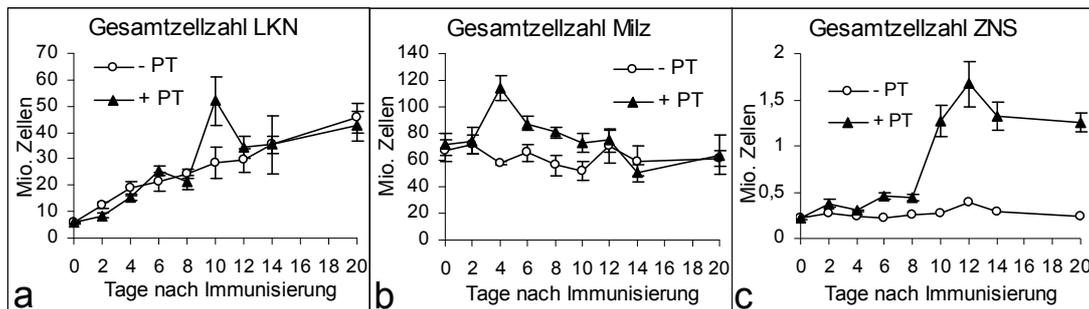


Abb. 16: Gesamtzellzahl in den Organen Lymphknoten (a), Milz (b) und ZNS 8 (c) bis zu 20 Tage nach Immunisierung

3.3.1. Gesamtzellzahl der drainierenden Lymphknoten

In einer unbehandelten gesunden Maus beträgt die Anzahl an Lymphozyten in den Popliteallymphknoten (es wurden jeweils die Lk beider Seiten gepoolt) im Durchschnitt 5,78 Millionen Zellen (SEM 0,37). Für Mäuse mit PTX-Injektion ergibt sich ein geradlinig ansteigender Verlauf der Zellzahlen mit einem Endpunkt von 42,48 Millionen Zellen (SEM 5,63) am Tag 20 nach Immunisierung. Als Besonderheit zeigt sich am Tag 10 p.i. ein von der beschriebenen Gerade ausreißender Wert von 51,92 Millionen Zellen (SEM 9,20).

Ohne PTX immunisierte Mäuse weisen ebenfalls einen geradlinigen Zellzahlverlauf auf, der sich kaum von Mäusen mit PTX-Injektion unterscheidet. Hier wird am Tag 20 p.i. ein maximaler Wert von 45,45 Millionen Lymphozyten (SEM 5,76) erreicht. Der bei erkrankten Mäusen auffallende Lymphozytenreichtum an Tag 10 konnte bei dieser Versuchsgruppe allerdings nicht festgestellt werden.

3.3.2. Gesamtzellzahl der Milz

Die Milz einer naiven Maus beinhaltet im Mittel 67,02 Millionen Lymphozyten (SEM 8,15).

Wird eine Maus mit Peptid in CFA und PTX i.v. immunisiert, so ergibt sich vom Tag 2 bis Tag 4 p.i. ein rascher Anstieg der Lymphozytenzahl auf bis zu 113,87 Millionen Zellen (SEM 9,63). Nach Erreichen dieses Höhepunkts nimmt die Zellzahl sukzessive bis zum Tag 14 p.i. auf 50,48 Millionen (SEM 6,39) ab, um dann wieder leicht auf 64,1 Millionen (SEM 15,06) anzuwachsen. Die deutlichste Abnahme der Zellzahl erfolgt zwischen den Tagen 12 und 14 p.i. zu einem Zeitpunkt, an dem in den erkrankten Mäusen die Zellen in das ZNS einwandern. PTX-negative Mäuse zeigen ein etwas anderes Verhalten. Vom Ausgangswert einer gesunden Maus sinkt die Lymphozytenzahl bis zum d 10 leicht auf 52,17 Mio. (SEM 7,07) ab, um dann aber am Tag 12 wieder einen erneuten Anstieg auf 70,03 Mio. (SEM 12,00) zu vollziehen. Schon ab Tag 14 p.i. sinkt die Zellzahl in der Milz wieder auf Werte um 60 Mio..

3.3.3. Gesamtzellzahl des Zentralnervensystems

Das ZNS einer SJL-Maus ist sehr lymphozytenarm. Makroskopisch erkennbar ist das schon während der Extraktion der Lymphozyten aus dem ZNS nach dem Zentrifugieren des Percoll[®]-Gradienten, wo man bei einer höheren Lymphozytenzahl eine deutliche Trübung über der Grenzschicht wahrnimmt. Bei unseren Versuchen ergab sich für eine unbehandelte Maus im Mittel eine Gesamtl lymphozytenzahl von 0,218 Millionen Zellen (SEM 0,021).

Die regelrechte Induktion einer EAE ergibt folgenden Zellzahlverlauf: Zunächst erfolgt bis Tag 8 p.i. ein Anstieg auf das Doppelte des Ausgangswertes mit 0,444 Millionen Zellen (SEM 0,036). Am darauf folgenden 10. Tag p.i. stellt sich dann mit 1,271 Millionen eine überaus deutliche Zunahme der Zellzahl im ZNS

passend zu den ersten Krankheitssymptomen dieser Mäuse dar. Der Anstieg setzt sich bis zum Tag 12 p.i. mit dann insgesamt 1,670 Millionen Zellen (SEM 0,243) fort. Anschließend stabilisiert sich die Zellzahl vom Tag 14 an mit 1,323 Mio. (SEM 0,152) bis zum Tag 20 p.i. mit 1,254 Mio. Zellen (SEM 0,106).

Im Unterschied dazu findet man bei Mäusen ohne PTX-Gabe keinen Anstieg der Lymphozytenzellzahl. Sie hält sich mit einer „flachen Spitze“ von 0,390 Mio. Zellen (SEM 0,041) an Tag 12 p.i. weitestgehend auf dem Ausgangsniveau vom Tag 0. Am Tag 20 p.i. zählt man im Schnitt 0,239 Mio. Lymphozyten (SEM 0,031).

3.4. Gesamtzellzahlen der CD4-positiven Zellen in Lk, Milz und ZNS

Nach Betrachtung der Gesamtzellzahl an Lymphozyten in den untersuchten Organen, soll als nächstes unter Verwendung eines CD4-Ak bei jeder Messung eine Analyse der Populationsdynamik der CD4-positiven Zellen vorgenommen werden. Abb. 17 zeigt für die Organe Lymphknoten, Milz und ZNS die Auswertung der FACS-Daten bezüglich der Gesamtzahl an CD4-positiven Zellen gegenüber dem Zeitpunkt nach Immunisierung mit und ohne PTX.

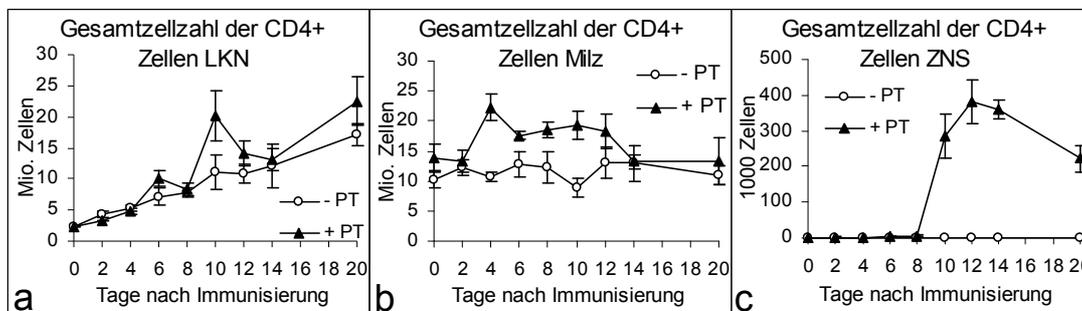


Abb. 17: Auswertung der Gesamtzellzahl der CD4+ Zellen in den Organen Lymphknoten (a), Milz (b) und ZNS 8 (c) bis zu 20 Tage nach Immunisierung

3.4.1. CD4-positive Zellen in den Popliteallymphknoten

In gepoolten Popliteallymphknoten nicht immunisierter Mäuse befinden sich als Ausgangswert 2,39 Mio. CD4-positive Zellen (SEM 0,08).

Der Verlauf der CD4+ Zellen in mit PTX immunisierten Mäusen gleicht im Überblick sehr der Gesamtzellzahl (siehe 3.3.1) innerhalb des Organs. Es ergibt sich

eine nahezu gleichmäßiger Anstieg der Zahl der CD4+ Zellen bis auf 22,46 Mio. (SEM 3,92) an Tag 20 p.i.. Auch findet man die aus der Gesamtzellzahl bekannte, steil aufsteigende Spitze an Tag 10 p.i. mit 20,26 Mio. CD4+ Zellen (SEM 4,01) wieder.

Bei Immunisieren ohne PTX erbringt die Datenauswertung ebenfalls analog der Gesamtzellzahl einen geradlinig ansteigenden Verlauf der CD4+ Zellen ohne markante Spitzen mit einem Maximum von 17,20 Mio. (SEM 1,71) am Tag 20 p.i..

3.4.2. CD4-positive Zellen in der Milz

Von den aus Abschnitt 3.3.2 erwähnten 67,02 Mio. Milzlymphozyten einer naiven Maus exprimieren 10,26 Mio. Lymphozyten (SEM 1,41) das CD4 Antigen auf der Zelloberfläche.

Bei Mäusen mit PTX-Gabe zur Immunisierung zeigt sich ein deutlicher und rapider Anstieg der CD4+ Zellen am Tag 4 auf 22,27 Mio. (SEM 2,18). Zwei Tage später sind die CD4+ Zellen dann wieder auf 17,57 Mio. (SEM 0,62) zurückgegangen, um dieses Level dann bis zum Tag 12 p.i. zu halten. Ein weiterer Abfall der Zahl CD4+ Zellen auf 13,26 Mio. (SEM 1,17) findet nachfolgend zum Tag 14 hin statt. Am Tag 20 p.i. befinden sich nach wie vor 13,32 Mio. (SEM 3,89) CD4+ Zellen in der Milz.

Keine großen Schwankungen finden sich für die Zahl der CD4+ Zellen bei Mäusen ohne PTX-Injektion bei der Immunisierung. Einzig eine kurzzeitige Abnahme auf 8,87 Mio. (SEM 1,67) an Tag 10 ausgehend von 12,36 Mio. (SEM 2,59) an Tag 8 p.i. fällt auf. Am Ende unseres Untersuchungszeitraumes befinden sich an Tag 20 p.i. noch 11,07 Mio. CD4+ Zellen (SEM 1,55) in der Milz.

3.4.3. CD4-positive Zellen im Zentralnervensystem

Das ZNS einer gesunden Maus (d0) beinhaltet durchschnittlich $0,771 \cdot 10^3$ (SEM $0,396 \cdot 10^3$) CD4+ Zellen. Bei Mäusen, welche ohne PTX immunisiert wurden, zeigt sich keinerlei Dynamik (im Vergleich zu Mäusen mit PTX-Injektion) der CD4+ Zellzahl. Die Werte schwanken zwischen einem Maximum von $1,509 \cdot 10^3$ (SEM $0,703 \cdot 10^3$) an Tag 8 und einem Minimum von $0,481 \cdot 10^3$ (SEM $0,185 \cdot 10^3$) an Tag 2.

Eine ganz andere Entwicklung fällt bei Mäusen mit PTX-Injektion auf: Bei zunächst ebenfalls moderaten Zellzahlen von bis zu $5,249 \cdot 10^3$ (SEM $2,266 \cdot 10^3$) CD4+ Zellen an Tag 8 nach Immunisierung steigt am Tag 10 die Zahl an CD4+ Zellen im ZNS plötzlich auf Werte von im Mittel $284,897 \cdot 10^3$ (SEM $59,956 \cdot 10^3$) an. Am Tag 12 wird eine maximale Anzahl von $383,408 \cdot 10^3$ (SEM $61,197 \cdot 10^3$) CD4+ Zellen erreicht. Über einen geringen Rückgang am Tag 14 sinkt die CD4+ Zellzahl bis zum Tag 20 wieder auf $222,324 \cdot 10^3$ (SEM $36,829 \cdot 10^3$) ab.

3.5. Populationsdynamik antigenspezifischer T-Helfer-Zellen in Lk, Milz und ZNS+

Um in den CD4-Zellpopulationen der Organe beider Versuchsgruppen antigenspezifische T-Helfer-Zellen zu identifizieren, wurde im nächsten Schritt die gleichzeitige Färbung sowohl des CD4-Antigens als auch des PLP- beziehungsweise MBP-spezifischen T-Zellrezeptors durchgeführt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Analyse der Gesamtzellzahl (Abb. 18) sowie der relativen Zellzahl Tm+/CD4+ Zellen (Tm+/CD4+ Zellen bezogen auf die Gesamtheit aller CD4+ Zellen im Organ, Abb. 19) im Verlauf von zwanzig Tagen nach Immunisierung. Da sämtliche Mäuse mit dem PLP-Antigen immunisiert wurden, stellt die Messung MBP-spezifischer T-Helfer-Zellen in diesem Experiment die Negativkontrolle dar. Nochmals soll an dieser Stelle die Notwendigkeit der MBP-Messung zur optimalen Bestimmung der Grenze zwischen Tm+ und Tm- Zellen erwähnt werden.

Eine repräsentative Auswahl von Rohdatendarstellungen ist jeweils in den folgenden Unterkapiteln zu den einzelnen Organen zu finden.

Ergebnisse

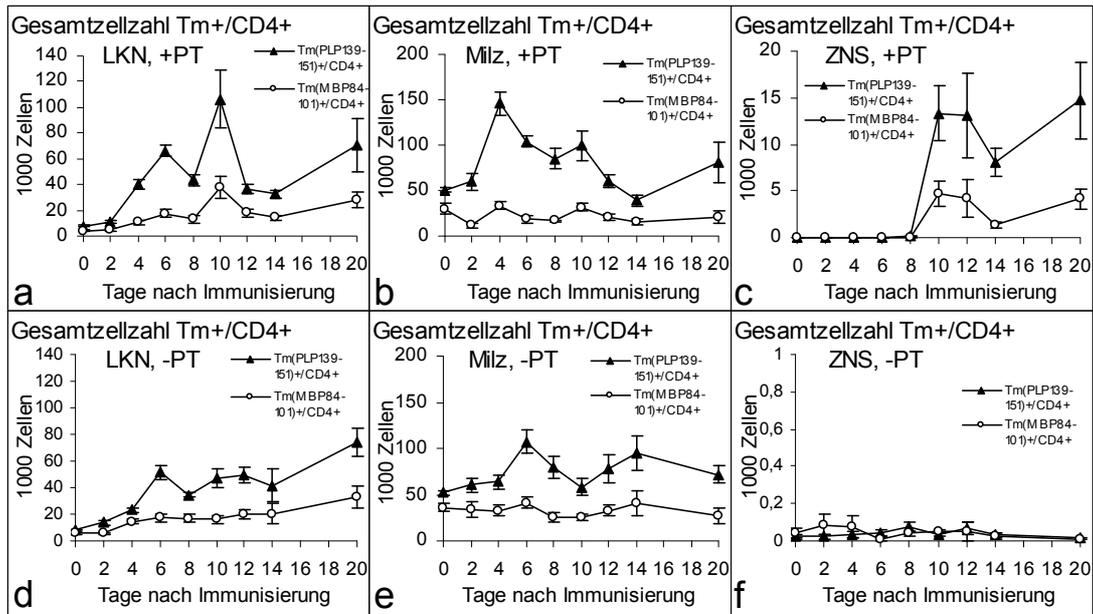


Abb. 18: Auswertung der Gesamtzellzahl der Tm+/CD4+ Zellen (Dreieck = PLP, Kreis = MBP) für Mäuse mit und ohne PTX-Injektion bei Immunisierung in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c+f) bis zu 20 Tage nach Immunisierung

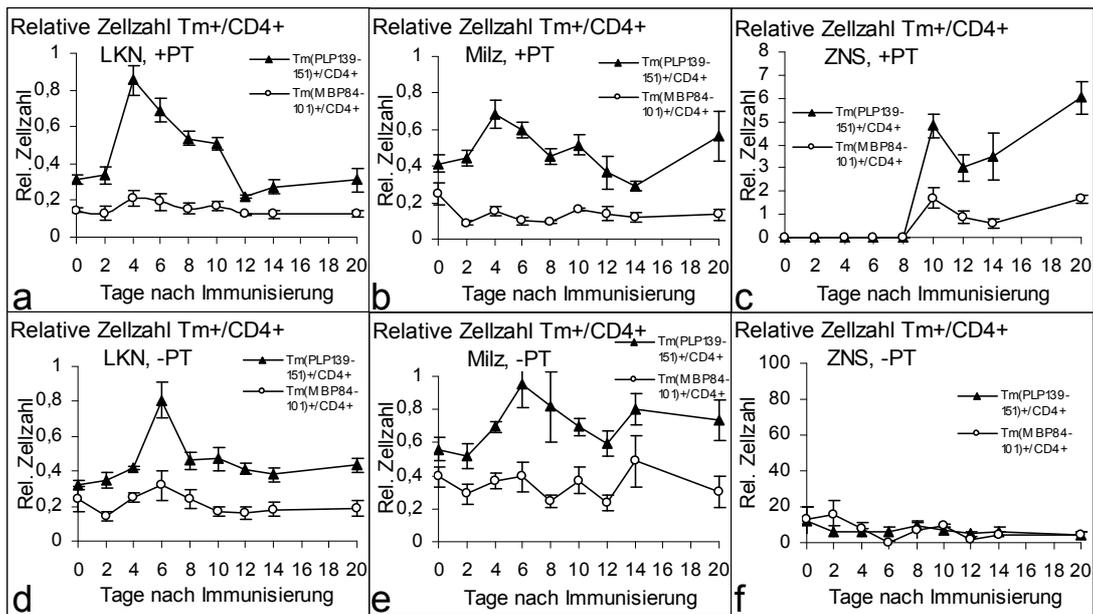


Abb. 19: Auswertung der relativen Zellzahl der Tm+/CD4+ Zellen (Dreieck = PLP, Kreis = MBP) für Mäuse mit und ohne PTX-Injektion bei Immunisierung in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c+f) bis zu 20 Tage nach Immunisierung

3.5.1. Analyse tetramerpositiver T-Helfer-Zellen im Lymphknoten

In den Popliteallymphknoten gesunder Mäuse finden sich im Mittel etwa $7,352 \cdot 10^3$ (SEM $0,602 \cdot 10^3$) Tm-PLP+/CD4+ Lymphozyten, was einer relativen Zellzahl von 0,312 % (SEM 0,024) entspricht (Rohdaten Abb. 20a).

Für SJL-Mäuse mit PTX-Injektion ergibt sich folgender Verlauf: es erfolgt vor allem ab dem zweiten Tag nach Immunisierung ein zügiger Anstieg der Tm-PLP+/CD4+ Zellen auf $66,209 \cdot 10^3$ (SEM $4,568 \cdot 10^3$) (Rohdaten Abb. 20b). Auffallend ist hier der Vergleich mit der relativen Zellzahl, da diese ihren Höhepunkt mit 0,853 % (SEM 0,080) schon zwei Tage früher, also am Tag 4 erreicht. Nach einem Abfall der absoluten Zellzahl am Tag 8 auf $43,396 \cdot 10^3$ (SEM 4,514) zeigt sich ein erneuter Anstieg am Tag 10 auf $106,251 \cdot 10^3$ (SEM $22,843 \cdot 10^3$). Allerdings lassen neben der hohen Standardabweichung dieses Wertes von über 20 auch der kontinuierliche Abfall der relativen Zellzahl bis zum Tag 10 auf 0,509 % (SEM 0,035) und die parallel sehr hoch gemessene Gesamtlymphozytenzahl an Tag 10 in den Lymphknoten (vgl. Abb. 16) an diesem doch hohen Wert zweifeln. Zudem steigt die absolute Zellzahl Tm-MBP+/CD4+ am Tag 10 über ein zu tolerierendes Maß annähernd parallel an, was ebenfalls gegen einen so hoch gemessenen Wert der absoluten Zellzahl an Tag 10 spricht. Den Wert an Tag 10 außen vor gelassen, fällt die absolute Zahl Tm-PLP+/CD4 Zellen über Tag 12 und 14 auf dann $32,758 \cdot 10^3$ (SEM $3,132 \cdot 10^3$) Zellen ab. Erst am 20. Tag nach Immunisierung zeigt sich ein wiederholter Anstieg auf $70,961 \cdot 10^3$ (SEM 20,597) Zellen, ebenfalls ein Wert mit etwas höherer Standardabweichung. Für die relative Zellzahl stellt sich vom Tag 10 zum Tag 12 ein zunehmend rascherer Abfall auf 0,219 % (SEM 0,005) dar, gefolgt von einer leichten Zunahme bis zum Tag 20 mit 0,311 % (SEM 0,065).

Ergebnisse

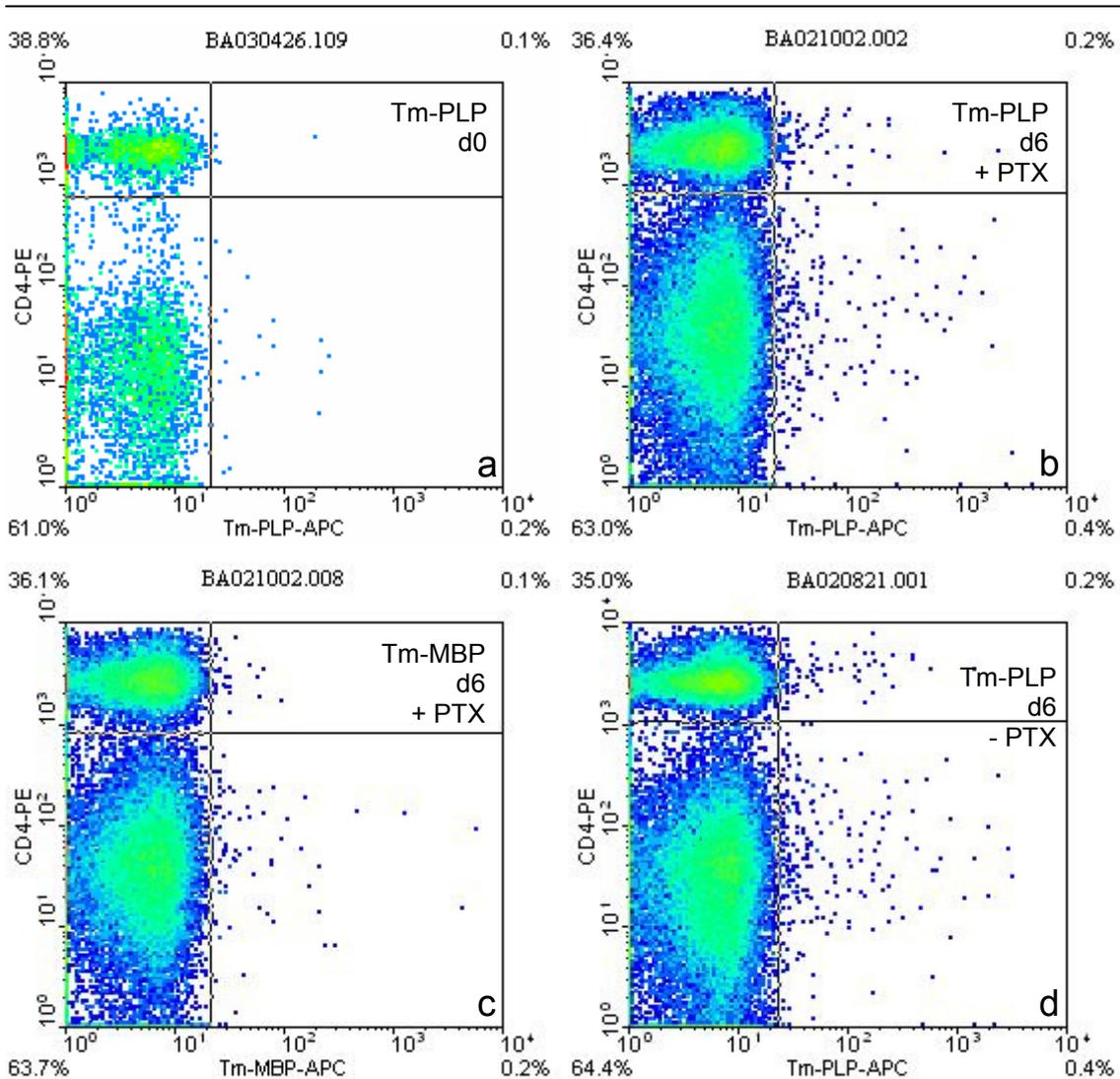


Abb. 20: Darstellung der LKN-Rohdaten zu folgenden Versuchsansätzen: Maus d0 Tm-PLP/CD4 (a), Maus d6 +PTX Tm-PLP/CD4 (b), Maus d6 +PTX Tm-MBP/CD4 (c), Maus d6 – PTX Tm-PLP/CD4 (d) (Unspezifische Bindung in b und d rechter unterer Quadrant, fraglich an Monozyten)

Bei der Versuchsgruppe ohne PTX-Gabe zur Immunisierung ergaben die Messungen die nachfolgend beschriebenen Verläufe: Ausgehend vom Wert gesunder Mäuse wird auch hier der erste Maximalwert der absoluten Zellzahl mit $51,330 \cdot 10^3$ (SEM $5,035 \cdot 10^3$) am 6. Tag erreicht (Rohdaten Abb. 20d). Es folgt ein leichter Rückgang bis zum Tag 8 ($34,252 \cdot 10^3$ (SEM $1,692 \cdot 10^3$)), worauf sich dann am Tag 12 ein zweiter, jetzt aber weniger ausgeprägter Höhepunkt von $49,604 \cdot 10^3$ (SEM $5,813 \cdot 10^3$) ergibt. Nach einem erneuten Rückgang am 14. Tag erreicht die absolute Zellzahl am Tag 20 einen Wert von $74,482 \cdot 10^3$ (SEM $10,653 \cdot 10^3$) Zellen. Die relative Zellzahl, ausgehend von 0,312 % (SEM 0,024) bei gesunden Mäusen, zeigt im 20-tägigen Verlauf nur eine besondere Auffäll-

ligkeit: Am Tag 6 nach Immunisierung ergibt sich eine steile an- und auch absteigende Spitze mit 0,807 % (SEM 0,106). Vor und nach Tag 6 pendelt die relative Zellzahl zwischen Werten von 0,3 % und 0,5 %.

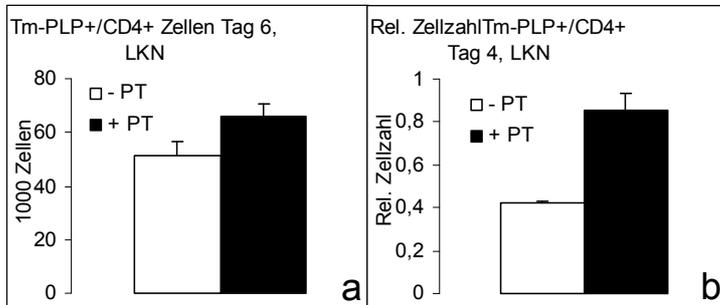


Abb. 21: Vergleich der absoluten Zellzahl im LKN zwischen beiden Versuchsgruppen an Tag 6 (a) sowie der relativen Zellzahl an Tag 4 (b).

Abb. 21 soll zusammenfassend nochmals zwei wichtige Punkte hervorheben: Bei beiden Versuchsgruppen ist der erste Höhepunkt der absoluten Zellzahl an Tag 6, wobei die absolute Zellzahl bei Mäusen mit PTX-Injektion um ca. $14 \cdot 10^3$ Zellen höher lag. Der am eindeutigsten auffallende Unterschied liegt im Erreichen des ersten Maximalwertes der relativen Zellzahl. Dieser wird bei Mäusen mit PTX-Injektion am Tag 4 um zwei Tage früher erreicht als bei Mäusen ohne PTX-Injektion. Es soll an dieser Stelle nochmals erwähnt werden, dass erste Krankheitssymptome bei Mäusen mit PTX-Gabe nicht vor Tag 10 p.i. auftreten und die Erkrankung bei längerer Beobachtung in Schüben verläuft. Aufgrund des Beobachtungszeitraums fällt es somit schwer, den bei beiden Versuchsgruppen auftretenden Anstieg der absoluten Zellzahl zum Tag 20 im Hinblick auf einen erneuten Krankheitsschub zwischen Tag 20 und 30 p.i. (vgl. Abb. 9) zu untersuchen.

3.5.2. Analyse tetramerpositiver T-Helfer-Zellen in der Milz

Die Milz gesunder SJL-Mäuse enthält im Mittel $50,370 \cdot 10^3$ (SEM $2,354 \cdot 10^3$) Tm-PLP+/CD4+ Lymphozyten, was einer relativen Zellzahl von 0,412 % (SEM 0,041) entspricht (Rohdaten Abb. 22a).

Bei Mäusen mit PTX-Injektion zeigte sich der im folgenden beschriebene Verlauf: Zwischen den Tagen 2 und 4 entwickelte sich ein Anstieg der absoluten Zahl Tm-PLP+/CD4+ um das Dreifache auf dann $145,702 \cdot 10^3$ (SEM $12,901 \cdot 10^3$)

Zellen (Rohdaten Abb. 22b). Fast ebenso schnell erfolgt ein Absinken der Zellzahl bis zum Tag 8 p.i. auf $84,972 \cdot 10^3$ (SEM $11,476 \cdot 10^3$). Nach kurzem Peak am Tag 10 p.i. fallen die PLP-spezifischen CD4+ Zellen bis zum Tag 14 sukzessive auf $38,989 \cdot 10^3$ (SEM $6,104 \cdot 10^3$), um wiederum am Tag 20 nach Immunisierung einen Wert von $81,439 \cdot 10^3$ (SEM $22,819 \cdot 10^3$) zu erreichen. Analysiert man die relative Zellzahl für diese Versuchsgruppe, so erhält man einen annähernd spiegelbildlichen Verlauf. Das Maximum von 0,684 % (SEM 0,075) wird ebenfalls an Tag 4 p.i. erreicht. Nach Absinken und zweitem kleineren Anstieg am Tag 10 findet man auch dann einen deutlichen Rückgang bis zum Tag 14 auf 0,290 % (SEM 0,027), gefolgt von einem erneuten Aufschwung der relativen Zellzahl bis zum 20. Tag p.i. mit 0,563 % (SEM 0,134).

Die zur Kontrolle mitgeführte Untersuchung von Tm-/MBP+ T-Zellen ergibt durchweg Werte auf niedrigem Niveau (Rohdaten Abb. 22c).

Die Versuchsgruppe der Mäuse ohne PTX-Injektion ergab folgende Zellzahlverläufe: Vom Ausgangswert einer gesunden Maus entwickelt sich bis zum 4. Tag p.i. (Rohdaten Abb. 22d) nur ein zögerlicher Anstieg der absoluten Zahl Tm-PLP+/CD4+ Zellen. Erst zum Tag 6 stellt sich eine etwas steilere Zunahme der Zellzahl auf $107,543 \cdot 10^3$ (SEM $12,966 \cdot 10^3$) dar. Anschließend dezimiert sich die Population bis zum Tag 10 wieder auf $57,863 \cdot 10^3$ (SEM $9,499 \cdot 10^3$). Nach erneuter Zunahme zum Tag 14 auf dann $95,067 \cdot 10^3$ (SEM $19,179 \cdot 10^3$) ergibt sich ein mäßiger Rückgang auf $72,033 \cdot 10^3$ (SEM $9,798 \cdot 10^3$) am Tag 20 p.i.. Auch hier findet man bezüglich der relativen Zellzahl einen vergleichbaren Verlauf mit erstem Höhepunkt an Tag 6 mit 0,949 % (SEM 0,138). Im Anschluss erstreckt sich der Abfall der relativen Zellzahl bis zum Tag 12 p.i. hin, hier findet man dann 0,597 % (SEM 0,077) Tm-PLP+/CD4+ Zellen. Nach Erreichen des zweiten Spitzenwertes von 0,805 % (SEM 0,095) an Tag 14 gibt die relative Zellzahl zum Tag 20 wieder auf 0,740 % (SEM 0,122) nach.

Betrachtet man zur Kontrolle die Verläufe für Tm-MBP+/CD4+ Zellen, so findet man nur in der Analyse der relativen Zellzahl in der Versuchsgruppe ohne PTX an Tag 14 einen Wert, der auffällig den Verlauf der Tm-PLP+/CD4+ Zellen imitiert und zudem eine zu stark ausgeprägte Standardabweichung aufweist.

Ergebnisse

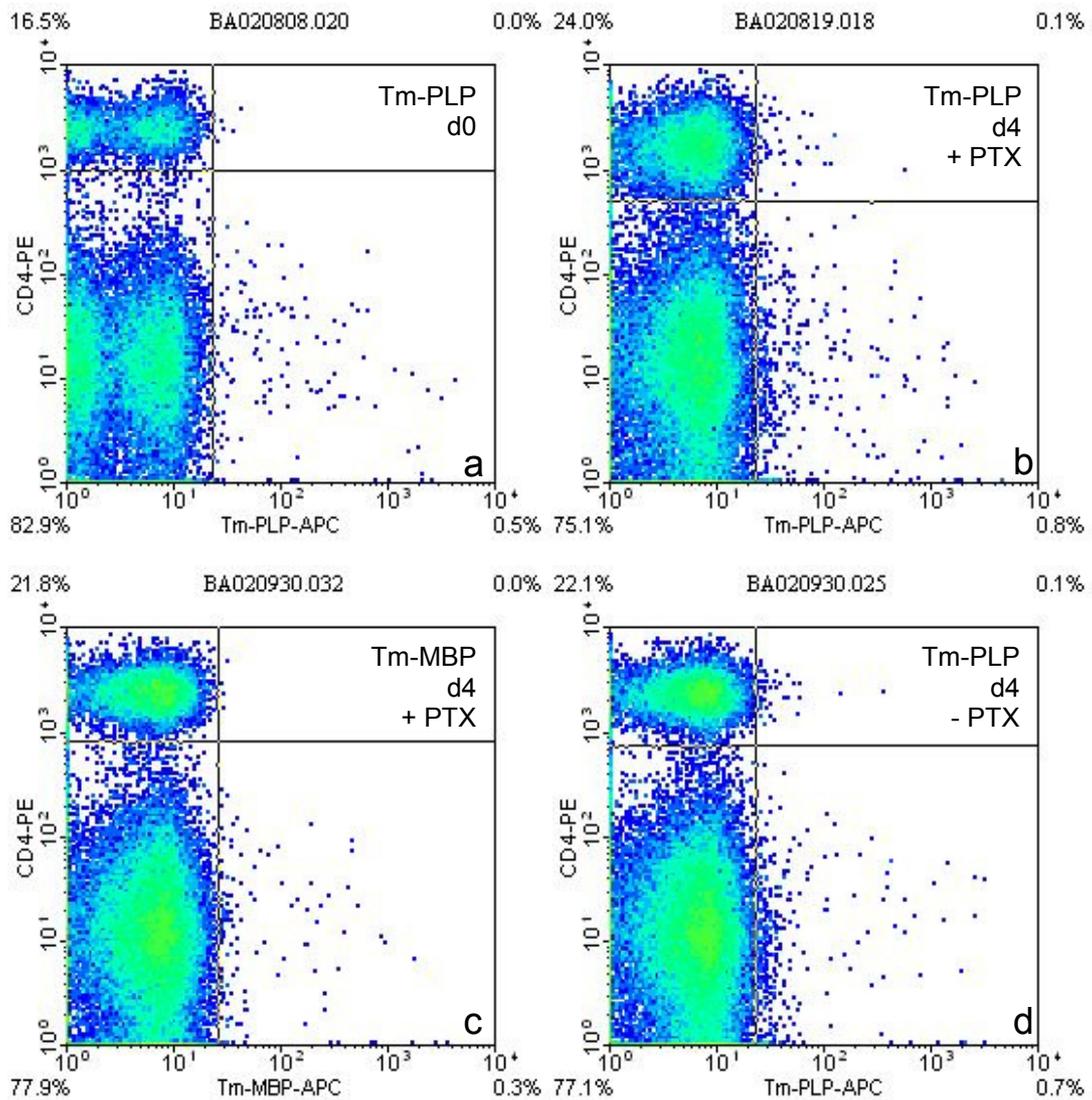


Abb. 22: Darstellung der Milz-Rohdaten zu folgenden Versuchsansätzen: Maus d0 Tm-PLP/CD4 (a), Maus d4 +PTX Tm-PLP/CD4 (b), Maus d4 +PTX Tm-MBP/CD4 (c), Maus d4 – PTX Tm-PLP/CD4 (d)

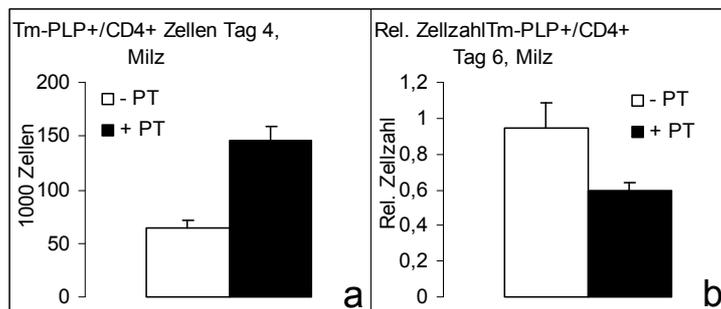


Abb. 23: Vergleich der absoluten Zellzahl in der Milz zwischen beiden Versuchsgruppen an Tag 4 (a), sowie der relativen Zellzahl an Tag 6 (b).

Abb. 23 veranschaulicht nochmals zwei wichtige Punkte dieses Versuchsschnittes: Im Bezug auf die absolute Zellzahl erfolgt der Anstieg in der Gruppe mit PTX-Injektion zwei Tage früher und in deutlich höherem Ausmaß verglichen mit dem Maximum an Tag 6 in der Gruppe ohne PTX-Injektion. Betrachtet man die Analyse der relativen Zellzahlen, so findet man das erste Maximum in der Gruppe mit PTX-Injektion mit Tag 4 p.i. ebenfalls um zwei Tage früher. Umgekehrt weist die Gruppe ohne PTX-Injektion allerdings höhere relative Zellzahlen, vor allem am Tag 6, auf.

3.5.3. Analyse tetramerpositiver T-Helfer-Zellen im ZNS

Basierend auf den Ergebnissen aus den Kapiteln 3.3.3 und 3.4.3 ergibt sich, dass in der Gruppe ohne PTX-Injektion nur vereinzelt CD4⁺ Zellen vorkommen, vergleichbar mit dem Zustand einer gesunden Maus. Verdeutlicht wird dies nochmals durch die Rohdatendarstellungen für eine gesunde Maus (Abb. 24a) und eine Maus ohne PTX-Injektion 10 Tage p.i. (Abb. 24d). Demnach findet sich in Abb. 19f die Darstellung der relativen Zellzahl nur der Vollständigkeit halber.

In der Versuchgruppe der erkrankten Mäuse nach PTX-Injektion lassen sich bis einschließlich Tag 8 nach Immunisierung ebenfalls, analog einer gesunden Maus, nur sehr wenige CD4⁺ Zellen nachweisen. Mit der Expansion der CD4⁺-Zellzahl ab Tag 10 nach Immunisierung findet man im ZNS erkrankter Mäuse durchschnittlich $13,352 \cdot 10^3$ Tm-PLP⁺/CD4⁺ Zellen (SEM $2,942 \cdot 10^3$) entsprechend 4,809 % (SEM 0,527) der Gesamtzahl CD4⁺ Zellen. Nach gleich bleibenden absoluten Werten an Tag 12 (die relative Zellzahl geht auf 2,995 % (SEM 0,572) zurück), ergibt sich weitere 2 Tage später eine leichte Reduktion auf $8,015 \cdot 10^3$ PLP⁺/CD4⁺ Zellen (SEM $1,5 \cdot 10^3$), was nun allerdings wieder mit einer relativen Zellzahl von 3,516 % (SEM 1,021) verbunden ist. Bis zum 20. Tag nach Immunisierung wächst die absolute Zahl PLP⁺/CD4⁺ Zellen wieder auf $14,725 \cdot 10^3$ (SEM $4,146 \cdot 10^3$) an – auffallend ist hier ein begleitender Anstieg der relativen Zellzahl auf 6,018 % (SEM 0,729). Eine für die Versuchsreihen repräsentative Darstellung der Rohdaten einer erkrankten Maus 10 Tage nach Immunisierung ist in Abb. 24b gezeigt.

Abb. 24c zeigt einen Rohdatensatz mit dem Tm-MBP einer erkrankten Maus ebenso 10 Tage nach Immunisierung mit PTX als Einzelmessung aus dem Gesamtverlauf der Tm-MBP+/CD+ Zellen in Abb. 18 und Abb. 19. Beim Analysieren der MBP-Kontrolle fällt auf, dass diese beim Zellverlauf erkrankter Mäuse nach PTX-Injektion doch parallel der PLP-Kurve mitreagiert. Man misst hier Tm-MBP+/CD4+ Zellzahlen von maximal $4,681 \cdot 10^3$ Zellen (SEM $1,389 \cdot 10^3$). Schöner wäre es, wenn sich auch hier durchweg Zellzahlen auf niedrigstem Niveau gezeigt hätten. Erklären lässt sich diese Mitreaktion höchstwahrscheinlich durch einen niedrigen Anteil unspezifisch gebundener Tetramere, verursacht durch die doch aufwendige und nicht gerade „zellfreundliche“ Aufbereitung und Isolation der ZNS-Lymphozyten. Bleibt in der Summe der durchweg deutliche Unterschied zwischen den Kurven der Tm-PLP+ und Tm-MBP+ CD4-Zellen.

Ergebnisse

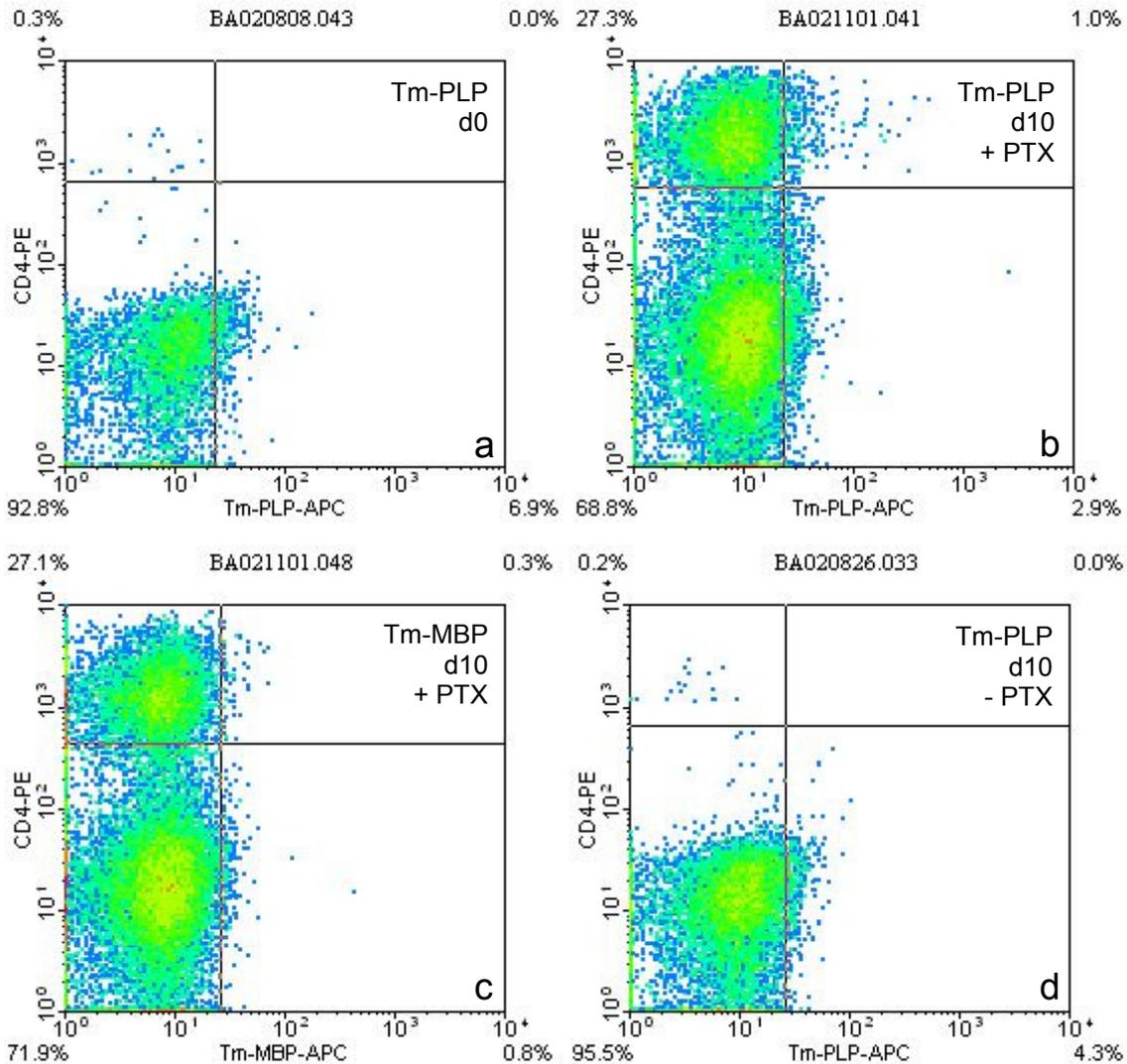


Abb. 24: Darstellung der ZNS-Rohdaten zu folgenden Versuchsansätzen: Maus d0 Tm-PLP/CD4 (a), Maus d10 +PTX Tm-PLP/CD4 (b), Maus d10 +PTX Tm-MBP/CD4 (c), Maus d10 -PTX Tm-PLP/CD4 (d) (Keine unspezifische Bindung in b und d rechter unterer Quadrant im ZNS im Vergleich zu Abb. 20)

3.6. Phänotypisierung der CD4 positiven Lymphozyten bezüglich der Aktivierungsmarker CD44 und CD69

Ausgehend von der Differenzierung und Identifizierung der PLP-Antigen spezifischen Zellen erfolgt in den weiteren Abschnitten deren Phänotypisierung bezüglich unterschiedlicher Antigene und Proteine auf der Zelloberfläche. Ziel dieser weiteren Klassifizierung ist es, von den exprimierten Zellmembranproteinen auf verschiedene Zellfunktionen, Zellzustände oder Zugehörigkeiten zu bestimmten Subpopulationen Rückschlüsse zu ziehen.

Ergebnisse

In diesem Unterkapitel sind zwei Phänotypenmarker zusammengefasst: CD44 und CD69. Beide Antigene lassen sich in der Gruppe der „Aktivierungsmarker“ subsummieren.

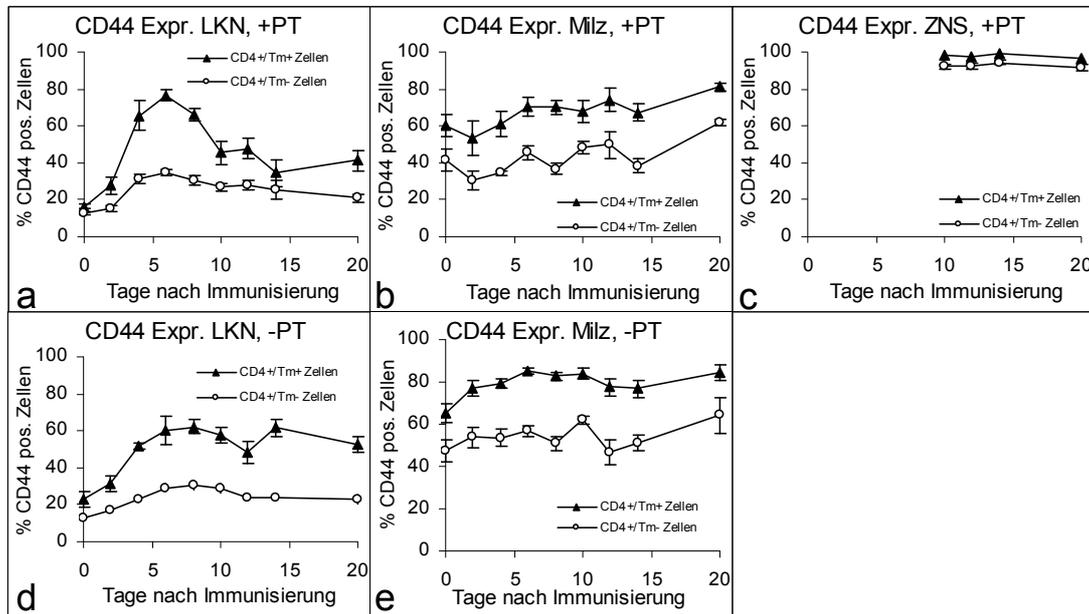


Abb. 25: Darstellung der CD44 Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c)

Abb. 25 stellt die Expression des Markers CD44 dar. Im Lymphknoten einer gesunden Maus findet man durchschnittlich eine CD44 Expression von 20%. Es zeigt sich für die PLP-spezifischen CD4 Zellen bei PTX-immunisierten Mäusen mit 76,6 % (SEM 3,0) an Tag 6 eine deutlich höhere und frühere Expression als bei Mäusen ohne PTX-Gabe, wo sich mit 62,3 % (SEM 3,5) das Maximum erst an Tag 8 einstellt (siehe auch Abb. 26a). Umgekehrt verhält es sich im weiteren Verlauf: Nach PTX-Immunisierung fällt ab Tag 10 die CD44-Expression wieder auf Werte um 40-45 % ab, wohingegen bei nicht erkrankten Mäusen sich ein Expressionsniveau zwischen 50 und 60 % hält (siehe auch Abb. 26b). Ausgewählte Rohdaten für die CD44-Expression im Lymphknoten an Tag 0 und Tag 6 sind in Abb. 27 (a und b) gezeigt. Bei beiden Versuchsgruppen bleibt die Expression von CD44 in der Population der Tm-PLP-/CD4+ Zellen vom Ausmaß deutlich unter derer der PLP-spezifischen CD4 Zellen zurück. Es werden jeweils nur Werte um 30-35 % an den Tagen 6-8 nach Immunisierung erreicht.

Ergebnisse

Ausgehend von der Milz einer gesunden Maus mit einer Expression von CD44 zwischen 60 und 65 % steigt bei PTX-immunisierten Mäusen die CD44-Expression auf Tm-PLP+/CD4+ Zellen bis auf 81 % (SEM 2,0) an Tag 20 an. Ohne PTX-Gabe zur Immunisierung erreicht die Expression von CD44 ein Niveau von 80 bis 85 % schon ab Tag 4 (siehe auch Abb. 26c).

Am auffälligsten präsentiert sich die CD44-Expression im ZNS erkrankter Mäuse: Hier findet man eine nahezu 100% Expression des CD44 Moleküls auf PLP-spezifischen CD4-Zellen bei ebenfalls ungefähr 90 bis 95 % Expression auf der restlichen CD4-Zellpopulation (Rohdaten hierzu in Abb. 27c).

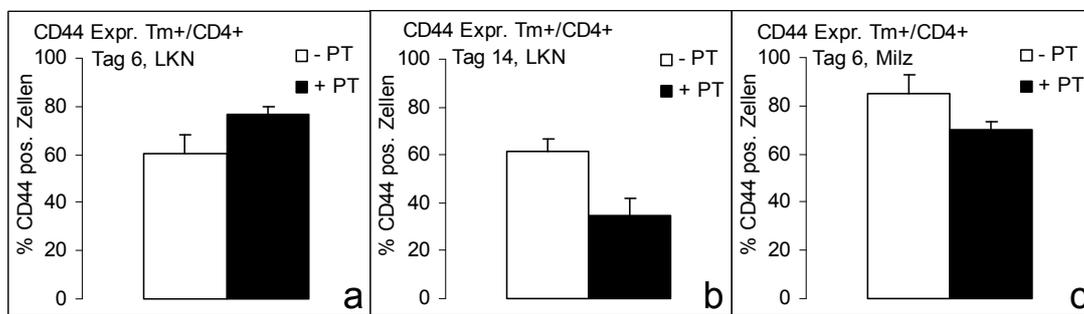


Abb. 26: Vergleich der CD44 Expression auf Tm-PLP+ CD4 Zellen zwischen beiden Versuchsgruppen (+PT/-PT) für folgende Versuchsansätze: LKN, d6 (a), LKN, d14 (b) und Milz, d6 (c)

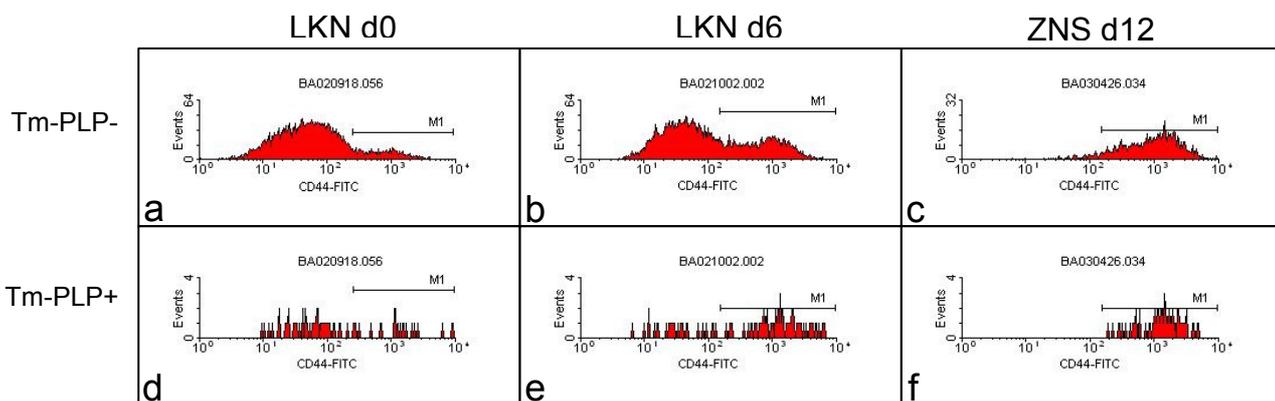


Abb. 27: Darstellung der Rohdatendiagramme für die CD44 Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm-PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)

Im folgenden sind in Abb. 28 die Expressionsverläufe des auch als „early activation marker“ bezeichneten Moleküls CD69 dargestellt.

Ergebnisse

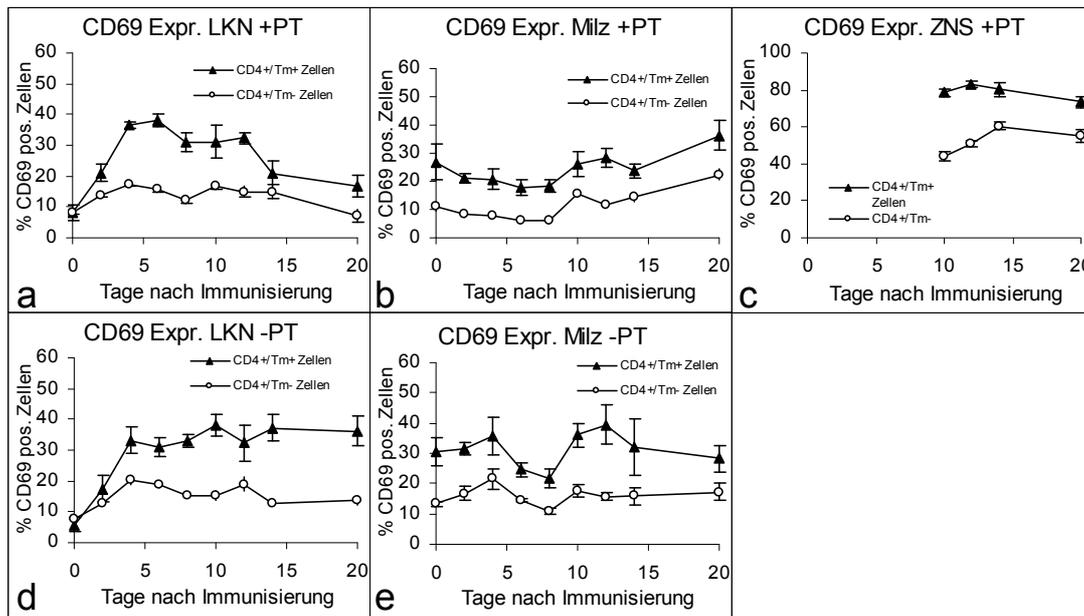


Abb. 28: Darstellung der CD69 Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c)

In den Popliteallymphknoten gesunder Mäuse findet man ein niedriges Expressionslevel von ca. 5-8 %. In beiden Versuchsgruppen zeigt sich in der Population der PLP-spezifischen Zellen ein rascher Anstieg schon bis zum 4. Tag nach Immunisierung mit dann 36,6 % (SEM 1,1) für die Gruppe mit PTX-Gabe und 33,3 % (SEM 4,3) für die Vergleichsgruppe. Bei erkrankten Mäusen fällt die CD69 Expression nach einem etwa gleich bleibenden Niveau um 30% an Tag 14 plötzlich auf 21,1 % (SEM 3,8) – die Reduktion setzt sich weitere 4 Tage später auf 17 % (SEM 3,5) fort. Im Gegensatz dazu bleibt bei den gesunden Mäusen der Versuchsgruppe ohne PTX-Injektion der Expressionsgrad von CD69 bis zum Tag 20 auf Werten um durchschnittlich 35 %.

Bei den Tm-PLP-/CD4+ Zellen wurde bei beiden Versuchsreihen ein angedeutet zweigipfeliges Verhalten mit jeweils wenig Expressionszuwachs gemessen. Nach Immunisieren mit PTX findet man hier Maxima mit 17,5 % (SEM 0,7) und 16,9 % (SEM 1,4) an den Tagen 4 und 10, bei der Vergleichsgruppe ohne PTX mit 20,3 % (SEM 1,3) und 19,1 % (SEM 2,1) an den Tagen 4 und 12. Ohne PTX-Injektion finden sich die umschriebenen Maxima an den Tagen 4 und 12 mit 20,3 % (SEM 1,3) beziehungsweise 19,1 % (SEM 2,1). Die Rohdaten zur

CD69 Expression in den Lymphknoten einer Maus mit PTX-Gabe sind für die Tage 0 und 6 in Abb. 29 (a, b und d, e) gezeigt.

Bei Analyse der CD69 Expression in der Milz fanden sich in gesunden Mäusen im Schnitt Werte zwischen 11 und 13 %. Es konnte keine Erklärung gefunden werden, warum bei gesunden Mäusen bei Betrachtung der Tm-PLP+/CD4+ Zellen eine auffallend höhere Expression von bis zu 30 % gemessen wurde.

In Mäusen mit PTX-Injektion fällt die CD69 Expression auf PLP-spezifischen CD4 Zellen bis zum Tag 8 auf 21,7 % (SEM 3,0). Erst anschließend findet man wieder einen Anstieg der Expression über einen ersten Gipfel am Tag 12 mit 28,3 % (SEM 3,3) auf 36,4 % (SEM 5,2) an Tag 20. Nahezu parallel verläuft die Expressionskurve der Tm-PLP-/CD4+ Zellen mit einem Niveau von 10 bis 15 % unterhalb derer der PLP-spezifischen CD4 Zellen.

In der Versuchgruppe ohne PTX-Gabe bei Immunisierung ergab sich in der Milz folgende CD69 Expression: PLP-spezifische T-Helfer-Zellen halten bis zum 4. Tag nach Immunisierung Ihre Expression von dann 35,8 % (SEM 6,2), um diese anschließend bis zum Tag 8 auf 21,7 % (SEM 3,0) abzubauen. Es zeigt sich eine erneute Hochregulation der CD69 Expression auf 39,5 % (SEM 6,4) an Tag 12, gefolgt von einem kontinuierlichen Rückgang auf 28,2 % (SEM 4,4) an Tag 20. Tm-PLP-/CD+ Zellen vollziehen auch hier den Expressionsverlauf der PLP-spezifischen Zellen auf einem ca. 10 % niedrigeren Niveau nach. Allein der zuvor beschriebene Anstieg an Tag 12 ist hier nur minimal ausgeprägt.

Interessant stellt sich für die Expression von CD69 die Datenlage im ZNS dar. Von allen PLP-spezifischen Zellen im ZNS einer erkrankten Maus präsentieren zwischen 75 und 85 % der Zellen durchweg das CD69 Antigen. Im Unterschied zum Expressionsverhalten von CD44 findet man auf Tm-PLP-/CD4+ Zellen das CD69 Molekül ansteigend im Krankheitsverlauf nur auf durchschnittlich 45 bis 60 % der Zellen. Exemplarisch sind Rohdaten der CD69 Expression im ZNS einer erkrankten Maus 12 Tage nach Immunisierung in Abb. 29 (c und f) gezeigt.

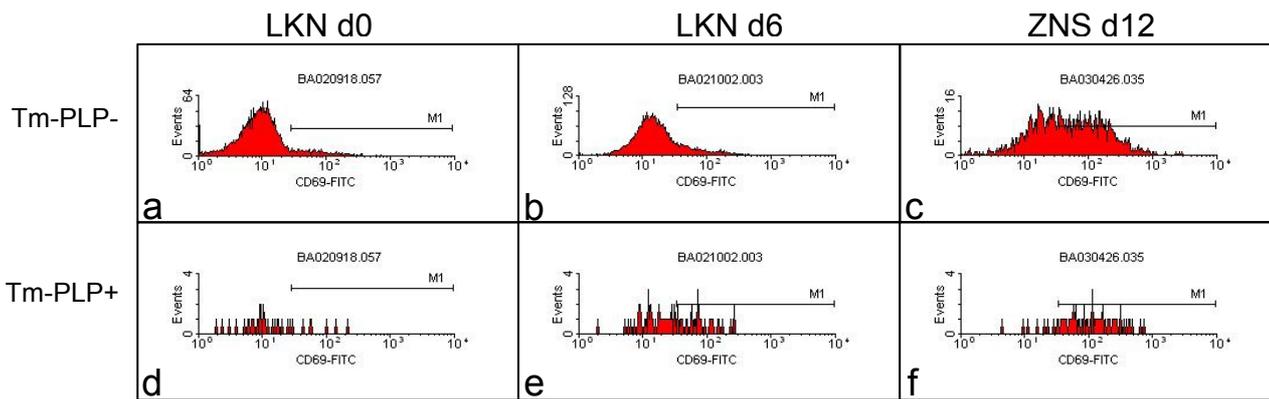


Abb. 29: Darstellung der Rohdatendiagramme für die CD69 Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm-PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)

3.7. CD40 Ligand Expression der CD4 positiven Zellen in Peripherie und ZNS

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Phänotypisierung bezüglich des Antigens CD40 Ligand (CD40L), auch bekannt als CD154. Wie der Name des Membranmoleküls schon beinhaltet, gibt es einen Gegenspieler, vielmehr Kommunikationspartner: das CD40 Antigen. Beide Partner spielen als kostimulatorische Moleküle eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion verschiedener Zellpopulationen. Abb. 30 zeigt die Verläufe der CD40L Expression in den untersuchten Organen beider Versuchsgruppen.

Bei gesunden Mäusen misst man in den Lymphknoten bei der Gesamtpopulation an CD4+ Zellen eine extrem niedrige Expression von CD40L von 2-3 %.

In der Versuchgruppe mit PTX-Gabe steigt die CD40L Expression auf Tm-PLP+/CD4+ Zellen vor allem ab dem 2. Tag nach Immunisierung langsam auf 7,7 % (SEM 2,7) am Tag 8 an. Darauf folgend ergibt sich eine zurückgehende Expression bis zum Tag 14 mit nur noch 3,0 % (SEM 0,8), wiederum gefolgt von einer mäßigen Zunahme auf 4,3 % (SEM 3,6) an Tag 20 (allerdings mit großer Standardabweichung in Relation zum gemessenen Wert). In der Population der Tm-PLP-/CD4+ Zellen gibt es bis auf einen Ausreißer am Tag 8 mit 6,0 % (SEM 2,4) CD40L Expression keine auffallenden Schwankungen. Abb. 31 (a, b und d, e) zeigt eine ausgewählte Rohdatendarstellung der CD40L Expression in Lymphknoten einer mit PTX immunisierten Maus an den Tagen 0 und 6.

Ergebnisse

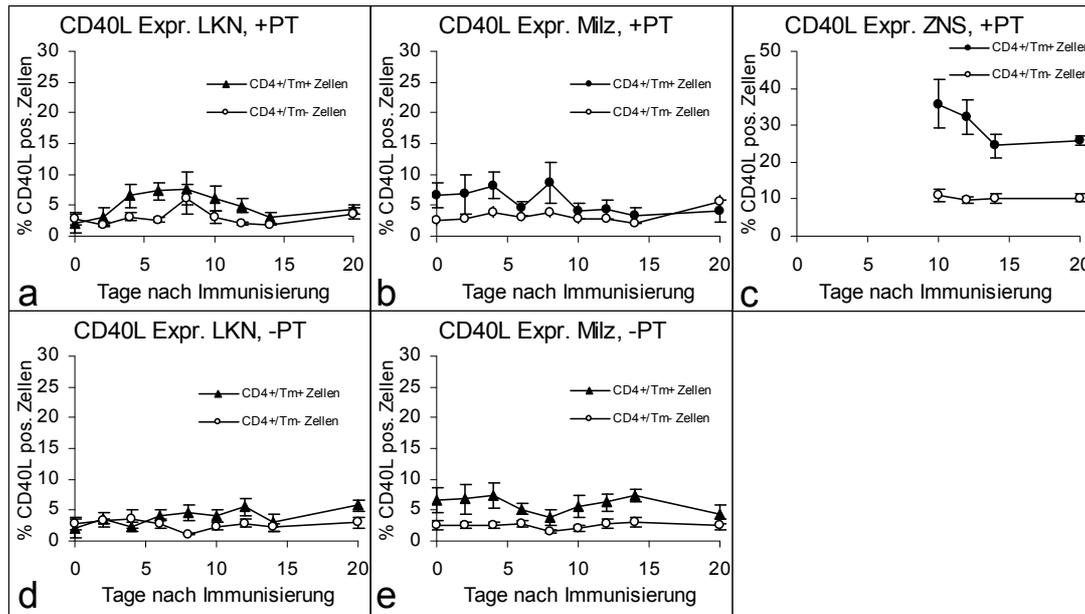


Abb. 30: Darstellung der CD40L Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c)

Ohne PTX-Injektion zur Immunisierung zeigt sich in den Lymphknoten bezüglich der CD40L Expression keine merkliche Dynamik.

Bei Betrachtung der Expressionsdaten in der Milz, ausgehend von circa 2,5 % bei gesunden Mäusen, findet man in der PTX+ Versuchsgruppe bei Tm-PLP+/CD4+ Zellen bis zum Tag 8 (bei nicht zu vernachlässigender Standardabweichung) eine etwas höhere Expression (bis 5 %) als bei unspezifischen CD4 Zellen. Im weiteren Verlauf ist in dieser Gruppe keine Differenz mehr festzustellen. In Mäusen ohne PTX-Injektion zeigt sich durchweg eine bis zu 5 % höhere CD40L Expression in PLP-spezifischen Zellen im Vergleich zur restlichen CD4 Zellpopulation.

Das in Bezug auf den Marker CD40L auffälligste Ergebnis fand sich im ZNS. Hier exprimieren an Tag 10 35,8 % (SEM 6,5) der Tm-PLP+/CD4+ Zellen das CD40L Antigen. Im weiteren Verlauf wird die Expression bis zum Tag 20 auf 25,9 % (SEM 1,2) herunterreguliert. Auch die Tm-PLP-/CD4+ Zellen weisen in bis zu 10 % der Fälle CD40L durchgehend auf der Zelloberfläche auf (ZNS Rohdaten in Abb. 31 c und f).

Ergebnisse

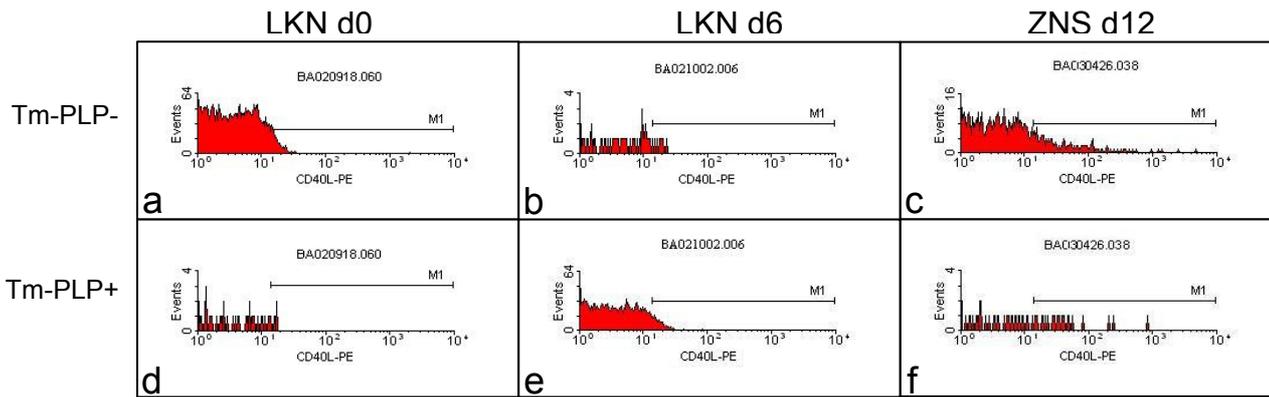


Abb. 31: Darstellung der Rohdatendiagramme für die CD40L Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm-PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)

3.8. Nachweis von Apoptose beziehungsweise von Oberflächenmarkern innerhalb der Apoptosesignalwege

3.8.1. Expression von CD95 (Fas)

Die Aufgabe des CD95 Moleküls (synonym: Fas, APO-1) wurde zuvor in Kapitel 1.6 im Rahmen der Apoptosemechanismen erläutert. Dieser Abschnitt zeigt die unterschiedliche Expression von CD95 in den Versuchsgruppen.

Analog der Einstellungen und Kompensationsmechanismen des FACS-Gerätes bei der Verwendung anderer FITC-gelabelter Antikörper wurde zunächst der Marker M1 (siehe Abb. 33) zur Auswertung der Rohdaten gewählt. Die Ergebnisse, basierend auf den Marker M1, sind in Abb. 32 dargestellt. Schnell zeigte sich, dass mit großer Wahrscheinlichkeit eine konstitutive Expression des Fas Moleküls auf der gesamten T-Helfer-Zellpopulation vorliegt. Es finden sich hier für alle Organe beider Versuchsgruppen, unabhängig von der Antigen-spezifität der CD4 Zellen, konstant Expressionswerte von über 85 bis 90 %.

Ergebnisse

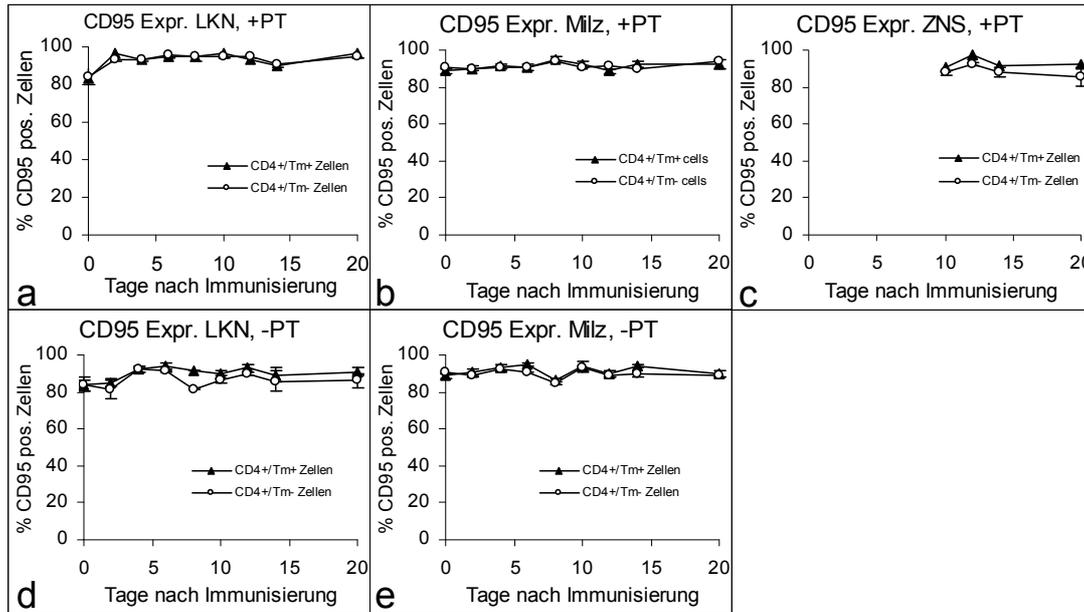


Abb. 32: Darstellung der CD95 Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c) (Marker bei 60 bzw. 350 bezogen auf eine Auflösung von 256 bzw. 1024)

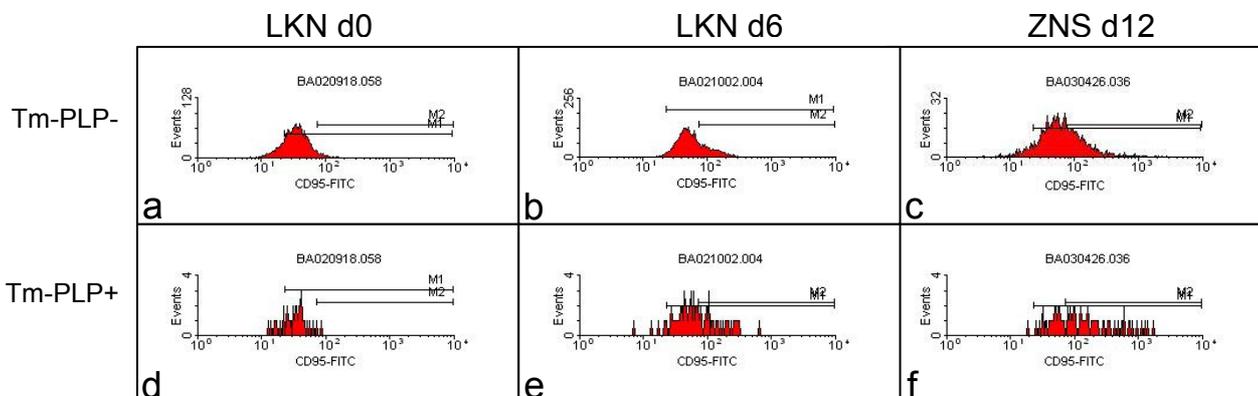


Abb. 33: Darstellung der Rohdatendiagramme für die CD95 Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm-PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)

Bei genauer Betrachtung der Rohdatendiagramme der CD95 Expression im Lymphknoten im Verlauf von Tag 0 bis Tag 6 nach Immunisierung (Abb. 33 a, d und b, e) fällt auf, dass ein Teil der CD4 Zellen CD95 noch stärker auf der Zellmembran präsentiert. Zur weiteren Identifizierung wurde der Marker M2 defi-

Ergebnisse

niert und daraufhin die Datensätze nochmals auf eine „CD95-high“ Expression analysiert. Abb. 34 fasst die CD95high Expression der CD4 Zellpopulationen in den untersuchten Organen zusammen.

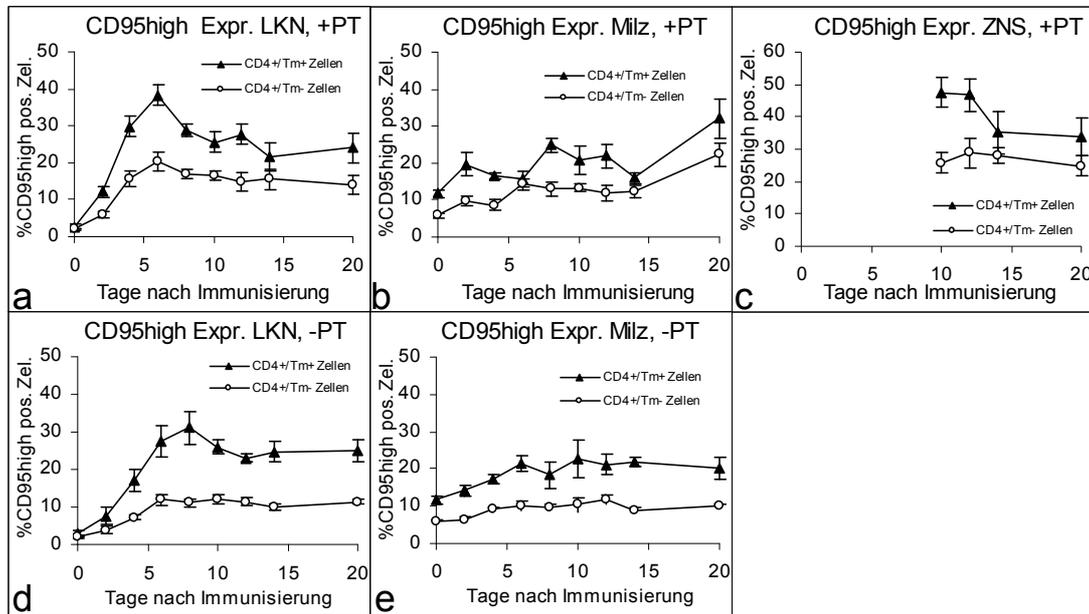


Abb. 34: Darstellung der CD95 „high“ Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c) (Marker bei 111 bzw. 477 bezogen auf eine Auflösung von 256 bzw. 1024)

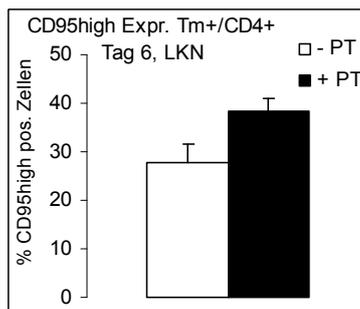


Abb. 35: Direkter Vergleich beider Versuchsgruppen bezüglich der CD95high Expression auf Tm+/CD4+ Zellen in Lymphknoten 6 Tage nach Immunisierung

Demnach nimmt auf PLP-spezifischen CD4 Zellen bei Mäusen mit PTX-Gabe die CD95high Expression steil von 2,7 % (SEM 0,8) bei gesunden Mäusen auf 38,3 % (SEM 2,6) an Tag 6 zu. Bei Tm-PLP-/CD4+ Zellen sind es im Vergleich dazu an Tag 6 nur 20,3 % (SEM 2,6) CD95high tragende Zellen. Innerhalb der gesamten CD4 Zellpopulation schließt sich ein Rückgang der CD95high Ex-

pression an, allerdings ist dieser bei Tm-PLP+/CD4+ Zellen mit am Ende 24,1 % (SEM 4,1) an Tag 20 stärker ausgeprägt.

Die Mausgruppe ohne PTX weicht von diesem Verhalten etwas ab: PLP-spezifische T-Helfer-Zellen erreichen das Maximum der CD95high Expression verspätet erst an Tag 8 mit 31,1 % (SEM 4,5), gefolgt von einer Herabregulation auf 25 % (SEM 3,1) an Tag 20. Hier reagieren auch die Tm-PLP-/CD4+ weniger deutlich mit – nach leichter Zunahme auf 12 % (SEM 1,5) bleibt die CD95high Expression auf diesem Niveau.

Abb. 35 zeigt nochmals den Unterschied der CD95high Expression in Lymphknoten beider Versuchsgruppen 6 Tage nach Immunisierung.

In der Milz stellt sich bei Gabe von PTX eine unregelmäßige CD95high Expression dar. Gesunde Mäuse beinhalten im Mittel 5-10 % CD95high klassifizierte CD4 Zellen. Hiervon ausgehend steigt in PLP-spezifischen Zellen die Expression unregelmäßig auf 25 % (SEM 1,9) an Tag 8. Nach leichtem Rückgang findet sich an Tag 20 schließlich eine Kohorte mit 32,1 % CD95high Expression.

Wenig Bewegung findet man in den Expressionsverläufen bei Mäusen ohne PTX Injektion. Tm-PLP-/CD4+ Zellen halten im Verlauf Werte zwischen 5 und 20 %. PLP-spezifische CD4 Zellen erreichen mit Tag 10 nach Immunisierung ein Maximum von 22,7 % (SEM 5,2), welches sie mit minimalen Verlusten bis zum Tag 20 halten.

Im ZNS erbringen die Messungen die höchste CD95high Expression. PLP-spezifische CD4-Zellen erkrankter Mäuse zeigen zu 47,6 % (SEM 4,4) an Tag 10 eine CD95high Expression. Nach gleich bleibenden Verhältnissen an Tag 12 sinkt diese Zellpopulation über Tag 14 und Tag 20 auf dann noch 33,9 % (SEM 5,8). Der Bestand an Tm-PLP-/CD4+ Zellen hat durchweg ab Tag 10 eine durchschnittlich 25-30% große CD95high Zellpopulation.

3.8.2. Expression von CD95 Ligand (Fas Ligand)

Im Rahmen der Apoptosesignaltransduktionswege ist das CD95L Molekül der Gegenspieler des CD95 (Fas/APO-1) Zellmembranrezeptors. CD95L ist in der Klassifikation der Antigene auch als CD178 bekannt. Das CD95L Expressionsverhalten der T-Helfer-Zellpopulationen ist in Abb. 36 aufgeführt.

Ergebnisse

Basierend auf einer CD95L Expression in Lymphknoten gesunder Mäuse von unter 2% ergibt sich nach Immunisierung mit PTX ein Anstieg bis zum Tag 4 auf 8,2 % (SEM 1,2) mit nachfolgendem Rückgang der Expression bis zum Tag 14 auf 0,65 % (SEM 0,4). Am Tag 20 fand sich wieder eine höhere Expression von 6 % (SEM 1,4). Tm-PLP-/CD4+ Zellen zeigen durchweg nur eine Expression zwischen 1 und 2 %.

Mäuse ohne PTX zur Immunisierung exprimieren an Tag 6 zu 6,5 % (SEM 1,5) CD95L. Nach niedrigen Werten um 3,5 % in den nachfolgenden Tagen misst man an Tag 20 eine Expression von 8,0 % (SEM 1,6). In dieser Versuchsgruppe liegt die höchste Expression von CD95L im restlich CD4 Zellkollektiv an Tag 14 bei 3,8 % (SEM 1,7). Zugehörige Rohdatenbeispiele für die CD95L Expression in Lymphknoten an Tag 0 und 6 sind in Abb. 38 zusammengefasst.

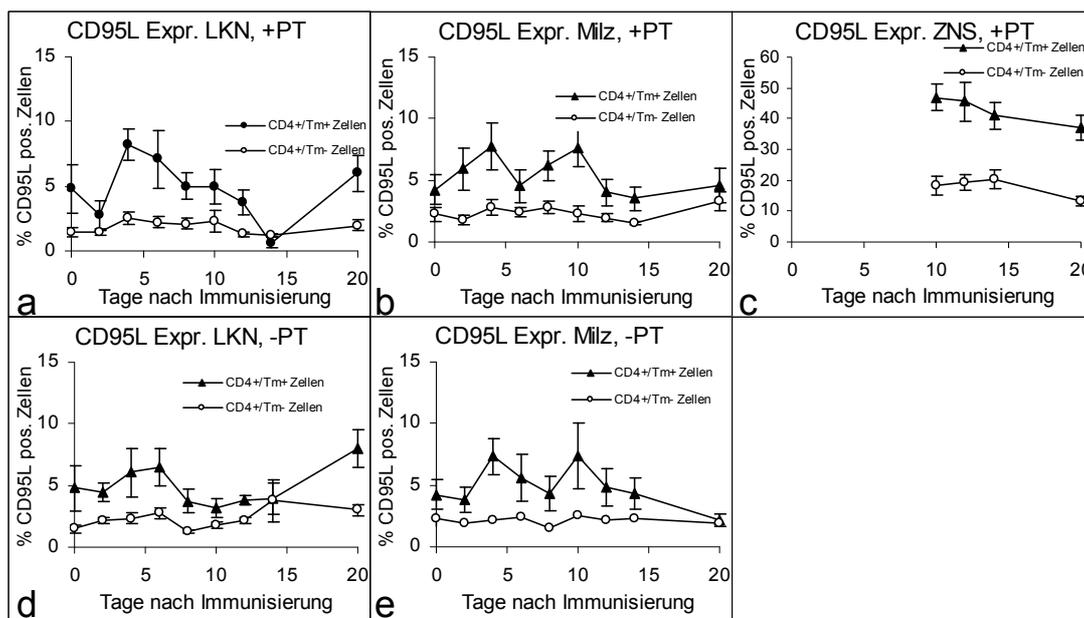


Abb. 36: Darstellung der CD95L Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c)

Bei Analyse der CD95L Expression der Milzlymphozyten ergeben sich bei beiden Versuchsgruppen ähnlich Verhältnisse: Die bei gesunden Mäusen vorhandene CD95L Expression von 2-4 % erhöht sich auf einen ersten Höhepunkt an Tag 4 auf ungefähr 7,5 %. Dem nachfolgenden Rückgang der Expression reiht sich ein zweiter Gipfel um Tag 10 mit wiederum durchschnittlich 7,5 % an. Tm-

Ergebnisse

PLP-/CD4+ Zellen verbleiben jeweils auf einem Expressionsniveau von 2 bis 2,5 %.

Vergleichbar mit den vorherigen Antikörpern findet sich die höchste Expression von CD95L auch wieder im ZNS. Tm-PLP+/CD4+ Zellen tragen in erkrankten Mäusen ab Tag 10 maximal 47 % (SEM 4,1) CD95L, wohingegen das restliche CD4 Zellkollektiv eine Expression von ungefähr 20 % aufweist. Entsprechende Rohdaten des ZNS zeigt Abb. 38 (c und f).

Ergänzend wurde bei diesem Antikörper auch die Expression auf CD4 negativen Zellen analysiert und in Abb. 37 für die einzelnen Organe zusammengestellt. Hier ergab sich durchweg, dass die CD95L Expression sämtlicher CD4 negativer Zellen mit der von PLP-spezifischen CD4 Zellen vergleichbar ist.

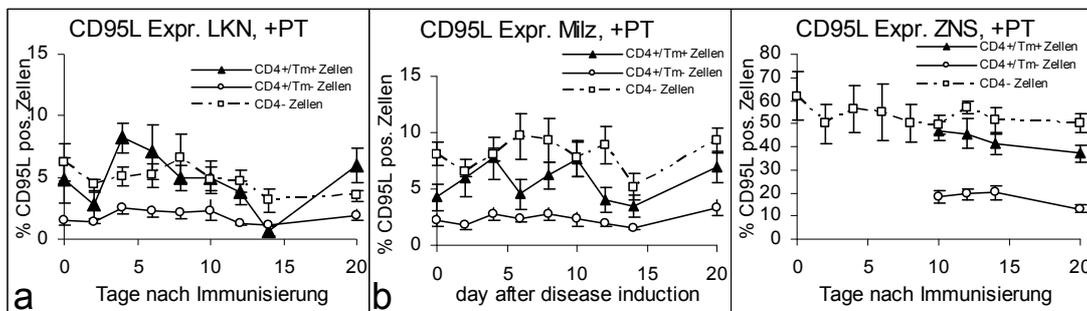


Abb. 37: Vergleich der CD95L Expression aus Abb. 36 mit der Expression von CD95L auf CD4 negativen Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung bei Mäusen mit PTX-Injektion in den Organen LKN (a), Milz (b) und ZNS (c)

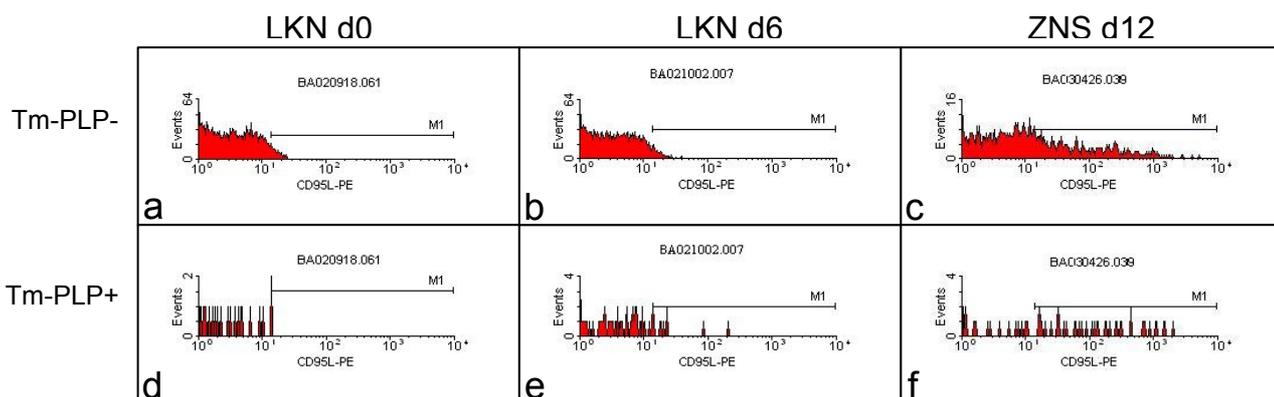


Abb. 38: Darstellung der Rohdatendiagramme für die CD95L Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm-PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)

3.8.3. Apoptosenachweis mittels Annexin V und Propidiumjodid

Im folgenden Abschnitt wird auf Messungen zum Apoptoseverhalten der unterschiedlichen CD4 Population eingegangen. Abb. 39 zeigt die Phänotypisierung bezüglich des Apoptosemarkers Annexin V, auf dessen Bedeutung schon unter 2.2.14 eingegangen wurde. Insgesamt gilt für alle untersuchten Populationen, dass in dieser Darstellung nur Propidiumjodid-negative Zellen eingegangen sind; daraus folgt, dass nekrotische oder schon tote Zellen herausgefiltert wurden.

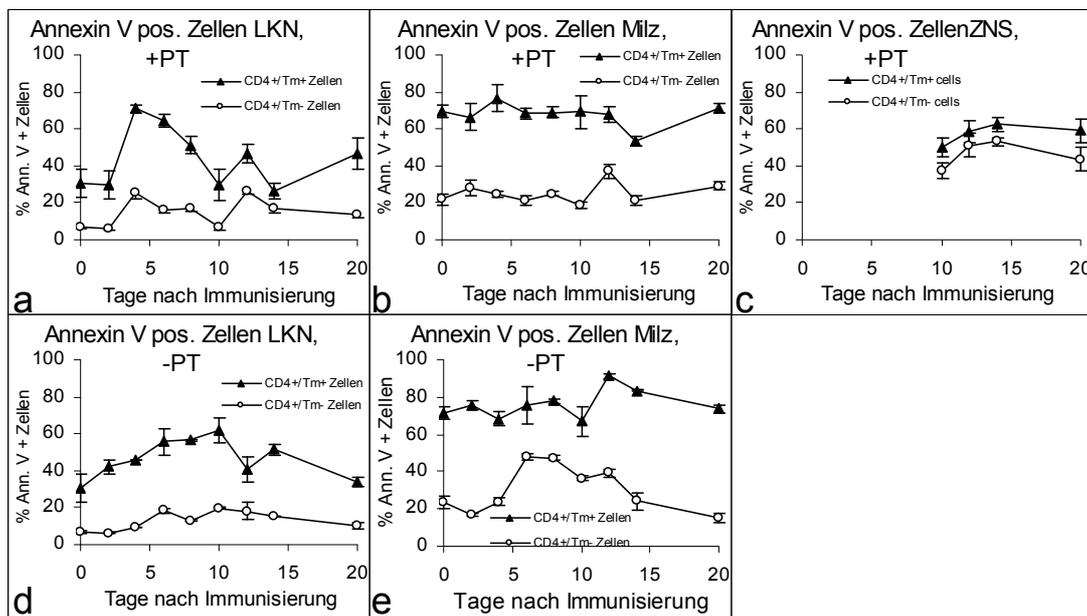


Abb. 39: Darstellung der Annexin V positiven Tm+/Tm- CD4 Zellen in den Organen LKN (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c) für beide Versuchsgruppen. Zuvor wurden PI+ und somit nekrotische bzw. spät apoptotische Zellen ausgegattet.

In nicht immunisierten Mäusen findet man durchschnittlich 30,36 % (SEM 7,64) Annexin V Expression auf PLP-spezifischen Helferzellen. Es findet sich kein Grund, warum in Lymphknoten wie auch in der Milz Tm-/CD4+ Zellen deutlich weniger Annexin V auf der Zellmembran tragen (6,82 % (SEM 0,86)).

Auffallend in der Gruppe mit PTX-Injektion ist die starke Zunahme von Tag 2 auf Tag 4 mit dann 70,83 % (SEM 1,94). Danach sinkt die Expression bis zum Tag 10 wieder auf 29,67 % (SEM 8,07), um nach erneutem Gipfel an Tag 12 (46,4 % (SEM 5,24)) und Tiefpunkt an Tag 14 am 20. Tag nach Immunisierung bei 46,4 % (SEM 8,42) zu liegen.

In Lymphknoten von Mäusen ohne PTX-Gabe steigt die Expression kontinuierlich bis zum Tag 10 auf 61,75 % (SEM 6,61) an, sinkt danach über 40,8 % an Tag 12 und 51,4 % an Tag 14 auf am Ende 33,95 % (SEM 2,51) am 20. Tag nach Immunisierung.

Für beide Versuchgruppen zeigen Tm-/CD4+ Zellen einen kongruenten Verlauf mit deutlich darunter liegendem Niveau.

Vom Ausgangslevel der Annexin V Expression auf Tm+/CD4+ Zellen in der Milz von etwa 70 % findet man in beiden Versuchgruppen bis zum Tag 10 keine große Variabilität. Interessant ist in diesem Zeitraum vor allem die Zunahme der Expression in der Gruppe ohne Pertussistoxin innerhalb der Population der Tm-/CD4+ Zellen zwischen Tag 4 und 6 von 20 % auf knapp 50 %.

Wohingegen erkrankte Mäuse am Tag 14 eine geringe Abnahme der Expression auf 53,2 % (SEM 2,72) zeigen, findet man bei gesunden Mäusen ohne PTX-Injektion noch eine weitere Zunahme auf bis zu 91,5 % (SEM 1,72) an Tag 12.

Für das ZNS findet man bei Tm+/CD+ Zellen erkrankter Mäuse ab Tag 10 eine Annexin V Expression von 50 % (SEM 5,13), die bis zum Tag 14 weiter auf 62,33 % (SEM 3,87) ansteigt. Tm-/CD4+ Zellen zeigen einen parallelen Verlauf mit nur geringfügig darunter liegender Expression.

In Abb. 40 ist für Mäuse mit PTX-Injektion zu den bekannten Daten der vorherigen Abbildung zusätzlich die Population der CD4+/AnnV+/PI+ Zellen und damit nekrotischen bzw. toten Zellen aufgetragen. Nennenswerte Zahlen findet man hier nur im ZNS mit maximal etwa 17 % der Gesamtpopulation.

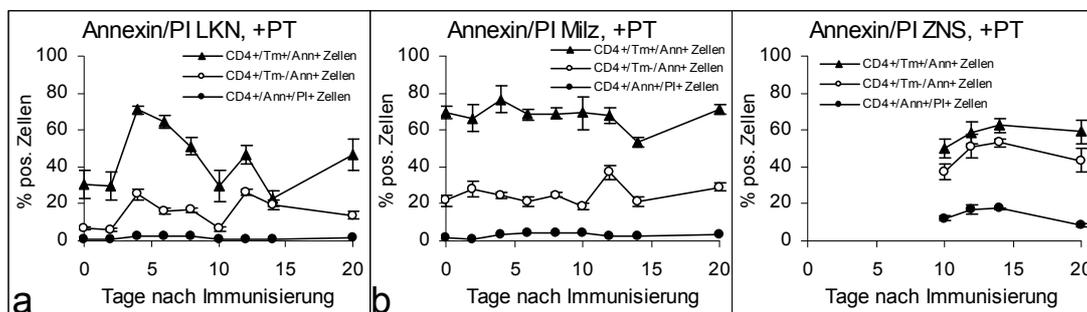


Abb. 40: Im Vergleich zu Abb. 39 zusätzliche Darstellung der CD4+/Ann+/PI+ Zellen der Versuchsgruppe mit PTX Injektion in den Organen LKN (a), Milz (b) und ZNS (c)

Abb. 41 zeigt abschließend eine repräsentative Darstellung einzelner Rohdaten der Versuchsgruppe mit PTX-Injektion für Lymphknoten an Tag 0 (a+d), Lymphknoten an Tag 6 (b+e) und ZNS an Tag 12 (c+f).

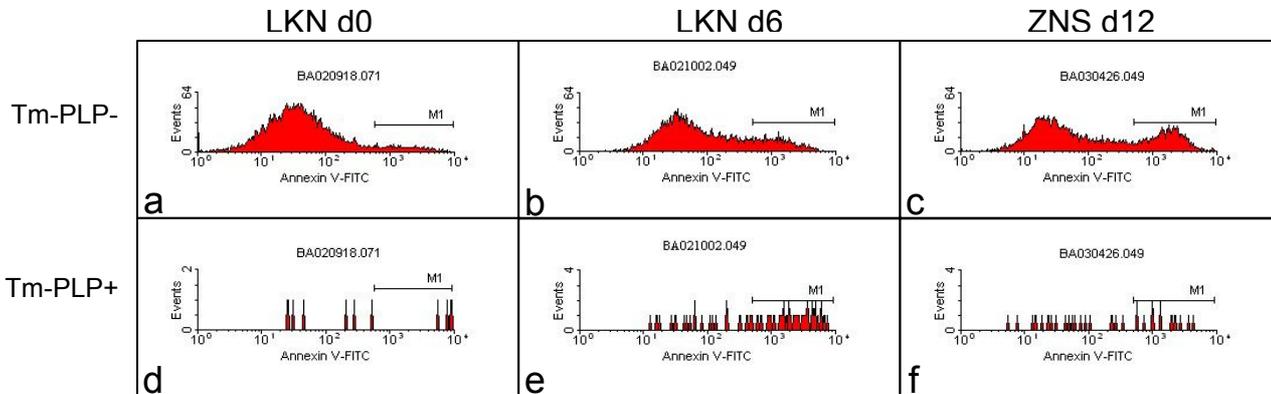


Abb. 41: Darstellung der Rohdatendiagramme für die Annexin V Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm-PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)

3.9. Ergänzende Immunfluoreszenzhistologie

Die nachfolgenden Abschnitte zeigen verschiedene immunhistologische Färbungen an Gefrierschnitten, die als grundlegende Vorarbeit für weitergehende Detailfärbungen in der Arbeitsgruppe dienen. Verwendet wurden gängige Marker in Einzel- und Mehrfachfärbungen, auf deren Basis in weiteren Arbeiten die antigenspezifische Komponente der CD4 Zellen integriert werden könnte.

3.9.1. Nachweis CD4 und CD8 positiver Zellen innerhalb von ZNS-Läsionen

Abb. 42 zeigt die Immunhistologie eines Kleinhirns einer erkrankten Maus 14 Tage nach Immunisierung mit PTX in verschiedenen Vergrößerungen. Gefärbt wurden die Zellkerne mit DAPI sowie CD4 positive Zellen. Zu erkennen sind Läsionen im Kleinhirnmark, die sich deutlich von den Kleinhirnwindungen abheben. Auffallend die Anreicherung von CD4 positiven Zellen allein innerhalb der Läsionen und in der näheren Umgebung einer Läsion. Die Kernregionen der Kleinhirnwindungen scheinen von CD4 Zellen frei zu sein. Vor allem Abb. 42c

zeigt die zirkuläre Färbung der CD4 Zellen entsprechend der zellmembranebundenen CD4 Moleküle.

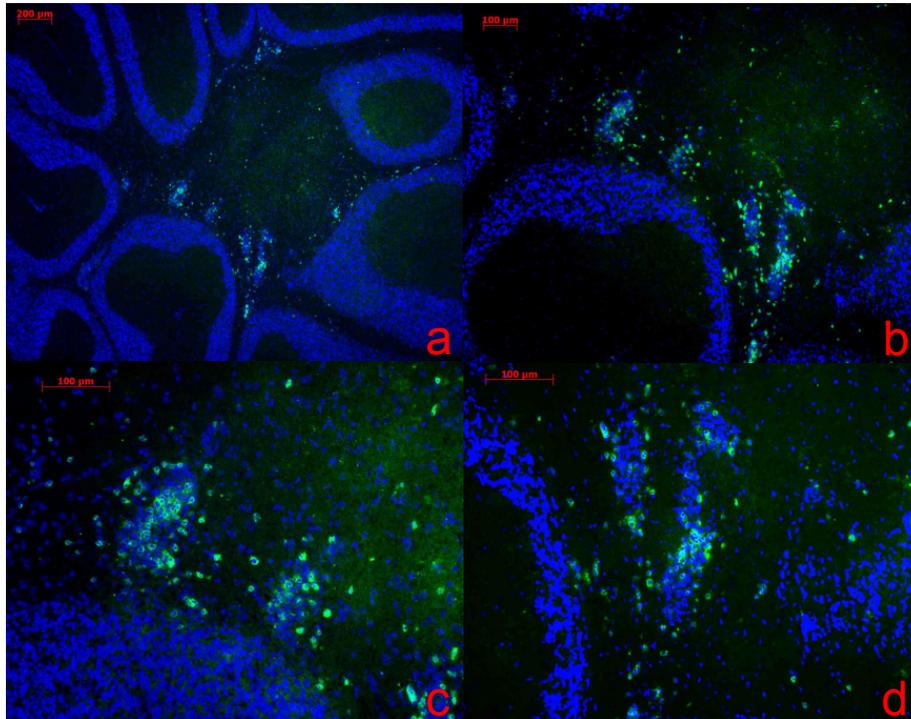


Abb. 42: Immunfluoreszenzhistologie einer immunisierten Maus mit PTX-Gabe (d14) aus dem Kleinhirn: Zellkernfärbung mit DAPI (blau), CD4-FITC (grün) (a: Vergrößerung 50x (Maßstab = 200 µm), b: 100x (Maßstab = 100 µm) und c,d: 200x (Maßstab = 100 µm))

In Abb. 43 sind Färbungen des CD4 und CD8 Antigens unter anderem auch in einer kombinierten Färbung zu sehen. Auffallend ist, dass CD8 Zellen innerhalb der ZNS-Läsion eher die Minderheit darstellen. Abb. 43 b untermauert die zellmembranständige Anfärbung des CD8 Antigens. Abb. 43 c zeigt im direkten Vergleich das Verhältnis von CD4 zu CD8 Zellen innerhalb einer Läsion, welches eindeutig zugunsten der CD4 Zellen ausfällt.

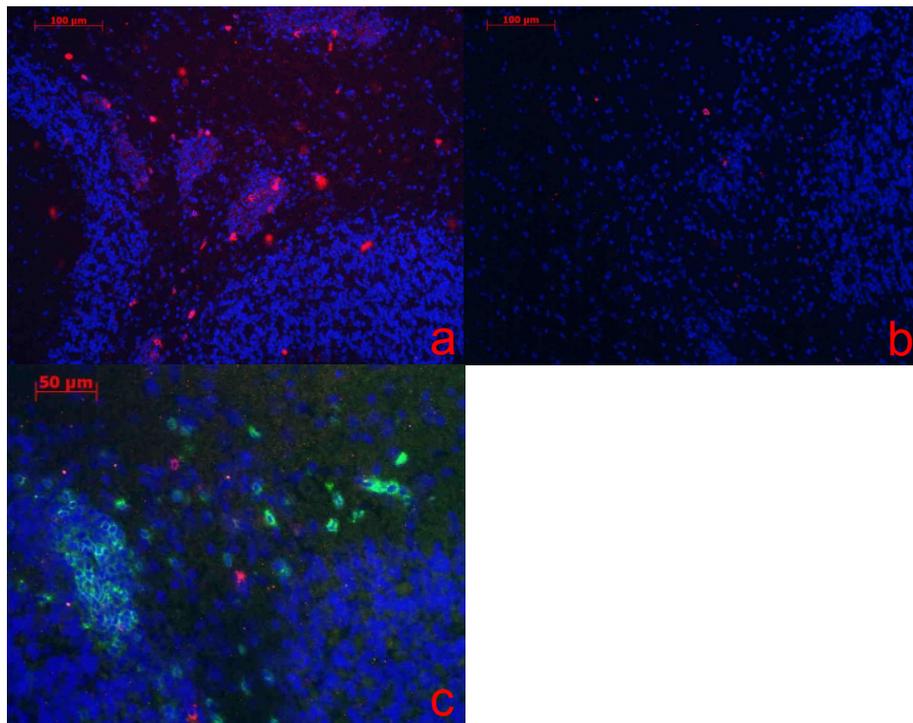


Abb. 43 Immunfluoreszenzhistologie einer immunisierten Maus mit PTX-Gabe (d14) aus dem Kleinhirn: Zellkernfärbung mit DAPI (blau), CD4-FITC (grün), CD8-PE (rot) (a,b: Vergrößerung 200x (Maßstab = 200 µm), c: 200x optisch (Maßstab = 50 µm, zusätzlich digital vergrößert)

3.9.2. Expression der Oberflächenmarker CD44, CD95, B220 und Anfärbung von Neurofilamenten in ZNS-Infiltraten

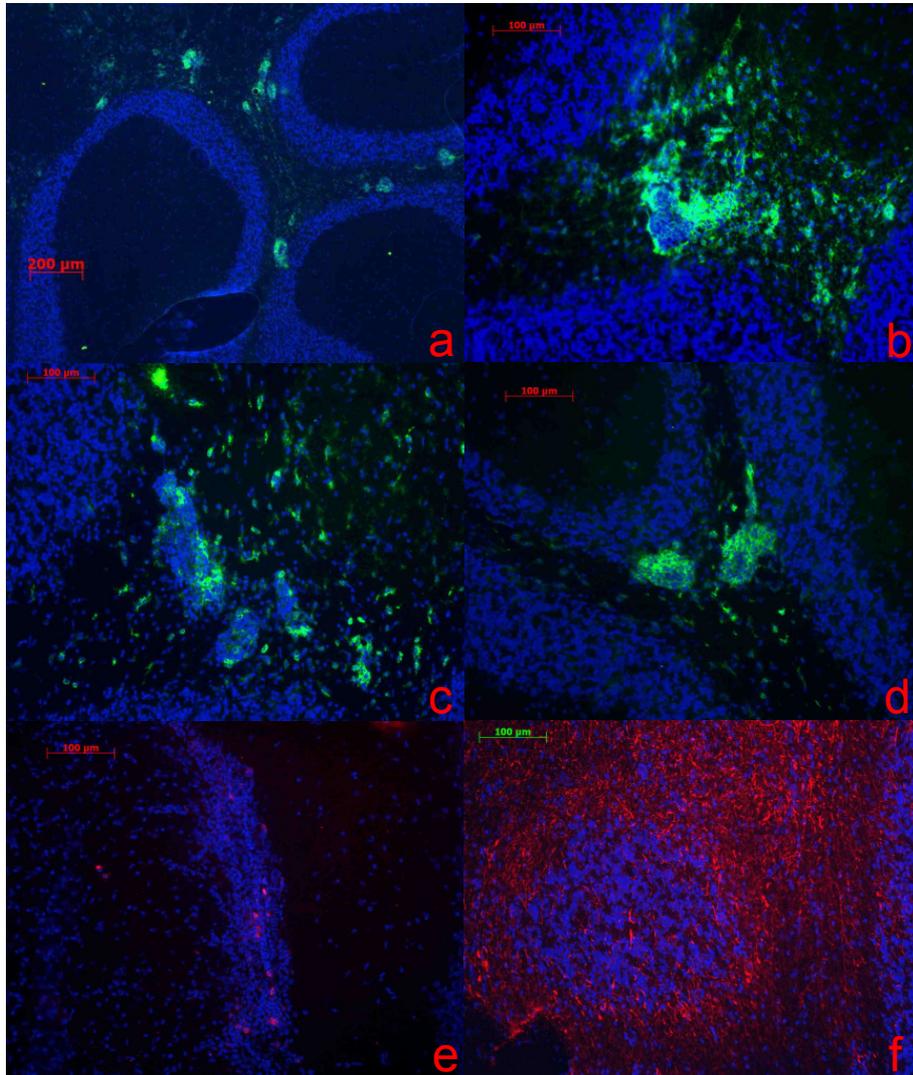


Abb. 44: Immunfluoreszenzhistologie einer immunisierten Maus mit PTX-Gabe (d14) aus dem Kleinhirn, Zellkernfärbung mit DAPI (blau): a,b: CD44-FITC (Vergrößerung 50x bzw. 200x, Maßstab = 200 μ m bzw. 100 μ m), c,d: CD95-FITC (Vergrößerung 200x, Maßstab = 100 μ m), e: B220-PE (Vergrößerung 200x, Maßstab = 100 μ m), f: Anti-Neurofilament-Cy3 (Vergrößerung 200x, Maßstab = 100 μ m)

Abb. 44 a und b zeigen die Expression des CD44 Antigens auf dem Hintergrund eines DAPI gefärbten Kleinhirnschnittes einer erkrankten Maus ebenfalls 14 Tage nach Immunisierung mit PTX. Auffallend ist, dass nahezu die gesamte Zellpopulation einer ZNS-Läsion das CD44 Antigen exprimiert. Diese Feststellung gilt nicht nur für die einzelne Läsion, sondern auch ein nicht zu vernachläss-

sigender Anteil der Zellen in der näheren Umgebung färben sich deutlich mit dem Anti-CD44-Antikörper an.

Ein etwas unterschiedliches Ergebnis findet sich für die Expression des CD95 Moleküls, gezeigt in Abb. 44 c und d: Hier findet man Läsionen die das Fas-Antigen sowohl nahezu ubiquitär aufweisen, als auch Läsionen mit nur im Schnitt 30% Expression.

B220, auch bekannt als CD45R ist in Mäusen ein B-Zellmarker, der insbesondere im Rahmen der frühen B-Zellentwicklung exprimiert wird und im Rahmen der Differenzierung zu Plasmazellen herunterreguliert wird. Abb. 44 e demonstriert somit das Vorhandensein von B-Zellen im ZNS einer erkrankten Maus. Die Färbung spiegelt das nur vereinzelte Auftreten von B-Zellen innerhalb einer Kleinhirnläsion wieder.

Abb. 44 e zeigt eine Färbung von Neurofilamenten innerhalb der Axone und somit außerhalb der Läsionen. Neben der Durchführung einer Färbung mit Sekundärantikörpern sollte hier eine Möglichkeit geschaffen werden, für weitere Experimente eine bessere anatomische Lokalisation zu den nervalen Strukturen im Zentralnervensystem zu ermöglichen.

3.9.3. Milzhistologie mit MOMA

In diesem Abschnitt wird auf die anatomische Lokalisation autoimmunologischer Vorgänge innerhalb der Milz eingegangen. Ziel war es, unter Verwendung eines Antikörpers gegen Makrophagen (MOMA-Cy3 (antimetallophilic macrophages)) speziell die Marginalzone eines Lymphfollikels mittels Immunhistologie darzustellen, um somit eine Abgrenzung der einzelnen Lymphfollikel von der restlichen Milzpulpa zu erreichen. Erst dadurch bietet sich die Möglichkeit, das Migrationsverhalten von T-Helfer- und anderen Zellen in den Versuchsgruppen zu untersuchen. Ähnliche Experimente unter Verwendung des MOMA-Antikörpers wurden von Cyster et al. [52] beschrieben. Grundlegend wurden zunächst HE-Schnitte der Milz von Mäusen aus beiden Versuchsgruppen angefertigt. Abb. 45 zeigt für die Versuchsgruppen repräsentative Ausschnitte der Milz-HE-Histologie. In der Übersicht gewinnt man den Eindruck, dass in Mäusen ohne PTX-Gabe die Dichte und Größe der weißen Pulpa und somit des lymphatischen Anteils der Milz höher ist als in Mäusen mit PTX-Injektion.

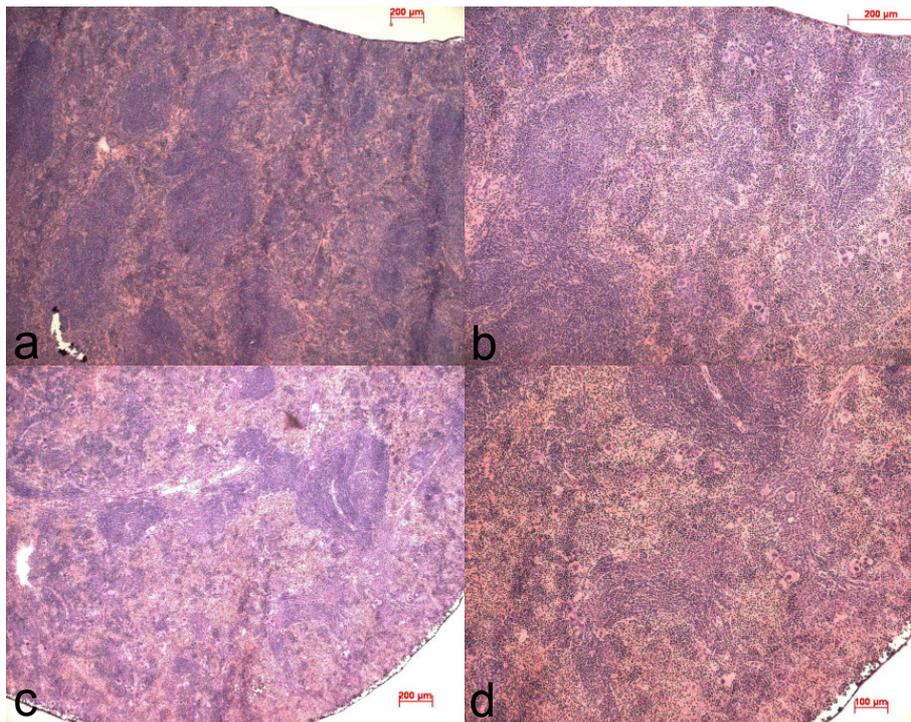


Abb. 45: HE-Histologie der Milz von Mäusen d10 nach Immunisierung ohne PTX (a und b) und mit PTX (c und d) (a, b und c Maßstab = 200 µm, d Maßstab = 100 µm)

Aufbauend auf der beschriebenen HE-Histologie soll anhand immunhistologischer Untersuchungen der in Abb. 46 dargestellte mikroskopisch-anatomische Aufbau der Milz nachvollzogen werden. Der verwendete MOMA-Antikörper färbt hierbei spezifisch Makrophagen innerhalb der „marginal zone“ an.

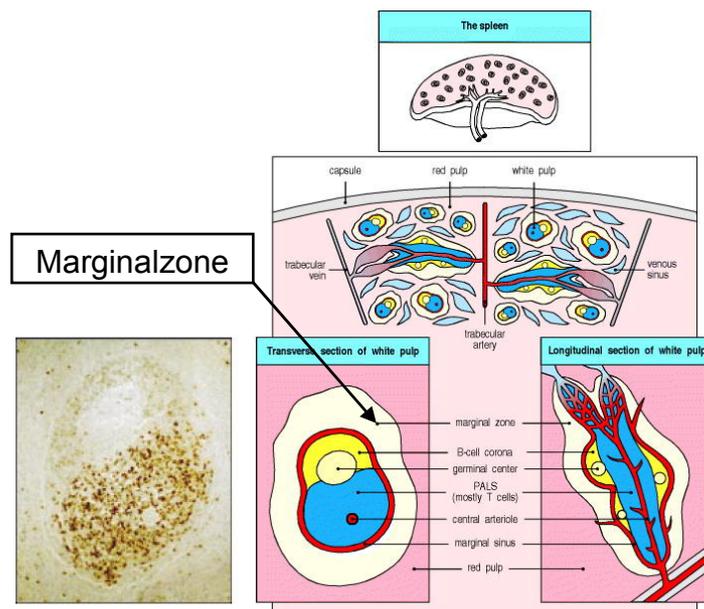


Abb. 46: Mikroskopische Anatomie der Milz (Abbildung aus [3])

Für Mäuse ohne PTX-Injektion stellt Abb. 47 eine Sammlung typischer Ausschnitte dar.

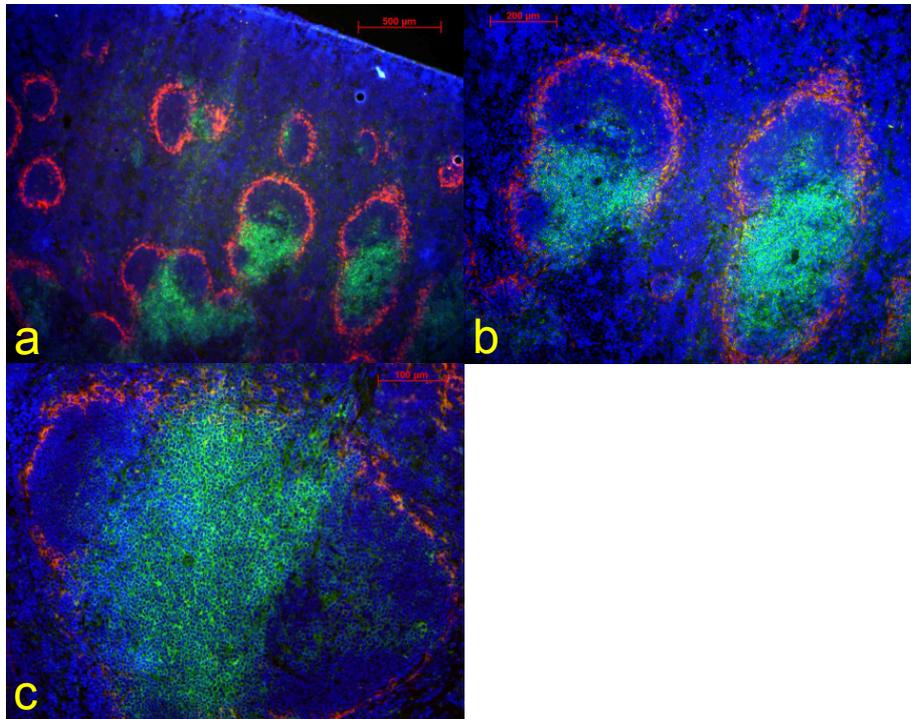


Abb. 47: Immunfluoreszenzhistologie der Milz einer immunisierten Maus ohne PTX-Gabe (d10): Zellkernfärbung mit DAPI (blau), CD4-FITC (grün) und MOMA-Cy3 (anti-metallophilic macrophages) (a: Vergrößerung 50x (Maßstab = 500 µm), b: Vergrößerung 100x (Maßstab = 100 µm), c: Vergrößerung 200x (Maßstab = 100 µm))

Auffallend ist die durch MOMA-Antikörperbindung an Makrophagen rot eingefärbte Marginalzone. In grüner Darstellung die Gruppe der CD4 positiven Zellen innerhalb der periarteriellen lymphatischen Scheide (PALS), welche sich scharf von den als Polkappen anmutenden B-Zellregionen abgrenzt. Innerhalb der PALS sind vor allem in Abb. 47 b die zentral gelegenen Arteriolen als vakuoläre Aussparungen zu erkennen. Vergleichend dazu zeigt Abb. 48 eine Auswahl von Immunhistologien einer Mausmilz nach Immunisierung mit Pertussistoxin. In der Gegenüberstellungen findet man die CD4 Zellen hier weniger dicht gelegenen und von geringerer Anzahl als in Mäusen ohne PTX-Gabe. Allerdings lassen die bis jetzt angefertigten Schnitte mengenmäßig nicht eindeutig eine genaue Differenzierung eines eventuell unterschiedlichen Migrationsverhaltens zu. Sie sind mehr als grundlegende Arbeit für weitere Versuche anzusehen.

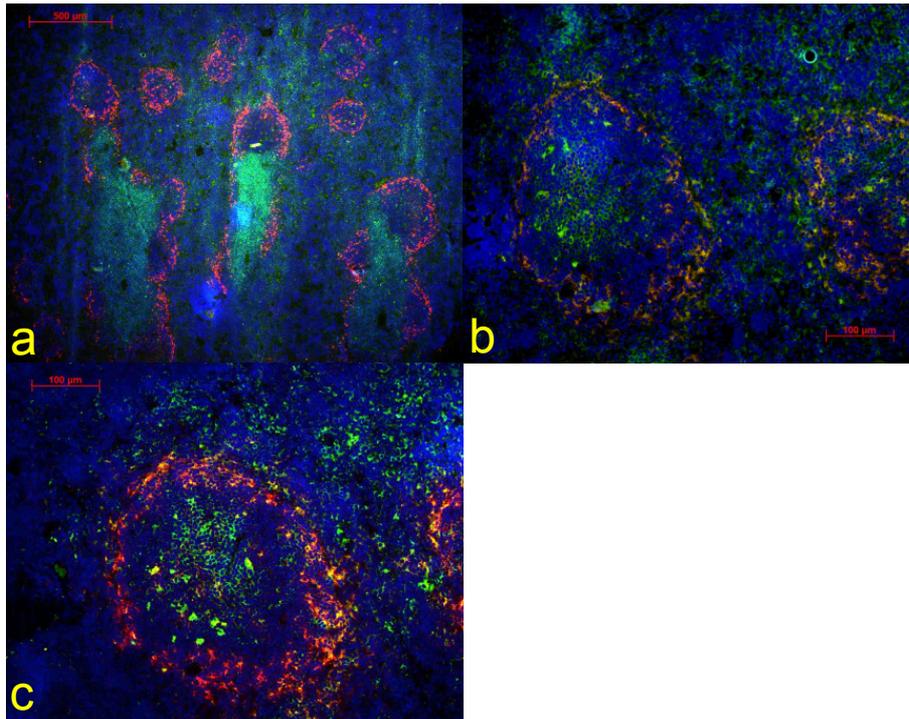


Abb. 48: Immunfluoreszenzhistologie der Milz einer immunisierten Maus mit PTX-Gabe (d10): Zellkernfärbung mit DAPI (blau), CD4-FITC (grün) und MOMA-Cy3 (anti-metallophilic macrophages) (a: Vergrößerung 50x (Maßstab = 500 µm), b: Vergrößerung 100x (Maßstab = 100 µm), c: Vergrößerung 200x (Maßstab = 100 µm))

4. Diskussion

Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen der Publikation Amend et. al veröffentlicht und werden im folgenden nicht gesondert zitiert [79].

4.1. Induktion von Autoimmunität durch Pertussistoxin – Zentral oder Peripher?

Die zentrale Frage, welche Mechanismen der Induktion von Autoimmunität durch Pertussistoxin zugrunde liegen, stellte sich um so mehr nach der Feststellung, dass ohne die Gabe von PTX keine unserer SJL-Mäuse an einer EAE erkrankte. Diese Beobachtung beschränkte sich nicht nur auf die fehlenden, sonst üblichen Krankheitsmerkmale. Unsere ersten Untersuchungen zeigten, dass sich weder histologisch, noch immunzytologisch CD4 Zellen, insbesondere spezifisch gegen das Antigen PLP reagierende Zellen, im ZNS finden lassen. Im weiteren bleibt ungewiss, an welchem Punkt, beziehungsweise an welchen Punkten im physiologischen Ablauf einer immunologischen Reaktion wie in unserem Versuchsaufbau Pertussistoxin seine Wirkungen vermittelt. Unterschiedliche Denkansätze lassen Hypothesen mit Wirkungsmechanismen entweder an peripheren lymphatischen Zellen, direkt an im ZNS der Mäuse lokalisierten Lymphozyten oder etwa unmittelbar an der Blut-Hirn-Schranke selbst zu.

Frühere Untersuchungen durch Amiel [45] und Tonra et al. [46] konnten zeigen, dass Pertussistoxin Veränderungen im Bereich des zerebralen Gefäßsystems auslöst, welche zur Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke führen. Bei Experimenten mit Stimulation von Lymphozyten im mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe mit PTX konnten Bargatze et al. [80] ebenfalls positive Wirkungen auf das Migrationsverhalten herausstellen.

Allerdings wird die Wirkung von PTX eben auf die Blut-Hirn-Schranke auch kontrovers diskutiert. So beschäftigten sich Adamson et al. [81] mit molekularen Mechanismen an der Blut-Hirn-Schranke. Sie konnten zeigen, dass die ADP-Ribosylierung von G-Proteinen auf endothelialen Zellen der Blut-Hirn-Schranke durch PTX zu einer starken Inhibition der Lymphozytenmigration über die Blut-Hirn-Schranke führte. Allerdings blieben andere Wege der Migrationsstimulati-

on, wie das ICAM-1 Adhäsionsmolekül, in ihrer Funktion von der PTX Wirkung unberührt. Hofstetter et al. [82] versuchten, als Ersatz für Pertussistoxin durch Setzen einer zerebralen Läsion die Blut-Hirn-Schranke zu durchbrechen, um präformierten Gedächtniszellen den Weg aus der Peripherie in das ZNS zu bahnen – auch hiermit konnte keine Erkrankung der Mäuse erzielt werden.

Unsere Ansätze in diese Richtung basierten auf eigenen Vorarbeiten durch Bischof et al. [76], durch die gezeigt wurde, dass eine Gabe von PTX nach peripherer Aktivierung beziehungsweise nach Migration der Zellen ins ZNS zu keiner Aggravation der Erkrankung führt.

Zur weiteren Prüfung einer zentralen Wirkung von PTX an der Blut-Hirn-Schranke stellten wir zunächst die Frage, ob die Wirkung von PTX auch bei einer verspäteten Gabe erst an Tag 6 nach Immunisierung mit PLP ohne PTX-Gabe ausreicht, um eine EAE zu induzieren. Hintergrund war die Überlegung, dass eine Gabe nur wenige Tage vor dem eigentlichen Krankheitsbeginn, also kurz vor dem eigentlichen Zeitpunkt einer zerebralen Migration der spezifischen T-Zellen, über eine mögliche Wirkung an der Blut-Hirn-Schranke zur Erkrankung führt. Nach nur wenigen Versuchsansätzen (Daten nicht gezeigt) konnten wir feststellen, dass mit diesem Schema keine EAE-Induktion innerhalb der zwanzigtägigen Untersuchungsdauer möglich war. Dies steht zudem im Einklang mit der Tatsache, dass Pertussistoxin nicht zwingend zur Induktion einer EAE notwendig ist. Bei EAE-Induktion durch „adoptiv transfer“-Protokolle überwinden antigenspezifische T-Zellen in Abwesenheit von PTX die Blut-Hirn-Schranke zum ZNS [83].

In unseren weiteren Überlegungen und Versuchen stellten wir die Wirkung von Pertussistoxin an Lymphozyten in der Peripherie in den Mittelpunkt.. Speziell in dem von uns verwendeten Tiermodell konnten Anderson et al. [36] zeigen, dass in SJL-Mäusen CD4-Zellen mit T-Zellrezeptoren spezifisch für das PLP 139-151 Antigen in größerer Anzahl vorhanden sind als T-Zellen mit anderer Spezifität. Durch Färbung der antigenspezifischen T-Helfer-Zellen ergab sich im Folgenden die Möglichkeit über Aktivierungsmuster und Phänotypisierung genauere Aussagen zu treffen.

4.2. Pertussistoxin führt zur früheren Aktivierung von CD4 Zellen in Lymphknoten

Unsere Versuche konnten zeigen, dass die Gabe von Pertussistoxin zu einer früher eintretenden Population der antigenspezifischen Zellen innerhalb der drainierenden Lymphknoten führt. Mit einem Maximum an Tag 4 nach Immunisierung, bezogen auf die relativen Zellzahlen, findet sich der Höhepunkt zwei Tage früher als bei Mäusen ohne PTX-Gabe. Ebenfalls zu sehen ist die verstärkte Population an der höheren Wachstumsrate bis zum Erreichen des Höhepunktes an Tag 6, welche insbesondere für die absolute Zellzahl in der PTX-Gruppe deutlicher ausfällt. Hier sei nochmals an Abb. 21 verwiesen. Zusätzlich zur Erkennung des Antigens durch Immunzellen, welche innerhalb der Gruppe ohne PTX-Gabe zur Population von antigenspezifischen CD4-Zellen führt, scheint PTX zusätzlich einen wachstumsfördernden Einfluss zu nehmen. Darüber hinaus ist interessant, dass die Wirkung des Toxins schon zu Beginn des Beobachtungszeitraums, also an den Tagen 0 bis 6, zu Unterschieden innerhalb der Versuchsgruppen führt. Dies ist auch entsprechend der Beobachtung, dass eine späte Gabe von Pertussistoxin, zumindest bezüglich der Krankheitsentwicklung keine Auswirkungen hat. Über die Steigerung der Gesamtzellzahl hinaus stellt sich die Frage, welche Eigenschaften der einzelnen Zelle, verändert durch Pertussistoxin, zur Entwicklung von Autoimmunität im ZNS führen.

Die beschriebene, wachstumsfördernde Wirkung des Toxins findet auch Ausdruck im Aktivierungsverhalten dieser PLP-spezifischen Zellen im Lymphknoten. Betrachtet man die Analyse des Aktivierungsmarkers CD44, einem Zelladhäsionsmolekül, so findet man für die PTX Gruppe sowohl einen rascheren Anstieg der Zellaktivierung, als auch ein um circa 15% höheres absolutes Aktivierungsniveau. Keine Unterschiede zeigten sich hier bei Betrachtung von CD69. Zelladhäsionsmoleküle, wie in unserem Experiment CD44, stellen im Extravasationsprozess durch die Blut-Hirn-Schranke wichtige Schaltstellen und Funktionsmoleküle dar. Denkbar ist durchaus, dass im Zusammenspiel mit anderen Zellparametern ein Expressionsniveau von Aktivierungsmarkern in bestimmter Ausprägung und zeitlicher Übereinstimmung zu anderen Vorgängen mit ausschlaggebend für eine Extravasation ist. Vergleichbare Wirkungen von

Pertussistoxin auf das Populations- und Aktivierungsverhalten fanden Papayannopoulou et al. [51] für die Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen. Zudem konnte durch Papayannopoulou dargestellt werden, dass es sich bei der PTX-Wirkung um einen langlebigen Effekt handelt, der durch die langsame Abgabe des PTX von Erythrozyten erreicht wird.

Weitere Versuche in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass PTX vor allem zur Induktion einer Th1-basierten Immunreaktion führt. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von Shive et al. [41] beschrieben, die die Wirkung von PTX bei Immunisierung mit Hühnereiweiß in inkomplettem Freund'schen Adjuvants untersuchten. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen werden hier die Wirkungen von PTX als indirekt, durch Antigen präsentierende Zellen vermittelt, beschrieben, da Shive et al. auf T-Zellen keine Veränderung der Aktivierungsmarker CD69 und CD44 feststellen konnten.

Auffallend an unseren Ergebnissen ist, dass gerade in der Gruppe mit PTX-Injektion das zuvor erreichte Aktivitätsniveau schon nach Erreichen des Höhepunktes wieder abzufallen beginnt. Orientiert man sich an den Ergebnissen der CD44 Phänotypisierung (siehe Abb. 25), so verbleiben antigenspezifische Zellen ohne PTX-Injektion auf konstantem Niveau nach dem Aktivitätshöhepunkt. Dieses Phänomen zeigt sich auch in der Markeranalyse von CD69, wo ebenfalls bis zum Tag 20 hin das Aktivitätsniveau bei Mäusen mit PTX absinkt. Beim Vergleich mit den Gesamtzellzahlen antigenspezifischer CD4+ Zellen im Lymphknoten, wo sich ab Tag 8 nur minimal geringere Zahlen in der Gruppe mit PTX finden lassen, bleibt hier offen, ob sich dieser Unterschied durch Herunterregulation der Marker, also Aktivitätsverlust, oder durch zahlenmäßig kompensiertes Migrationsverhalten (gegebenenfalls auch mit Apoptose), erklären lässt.

4.3. Verhalten von antigenspezifischen CD4+ Zellen in der Milz

4.3.1. PTX verhindert nicht das Eintreten von CD4+ Zellen in die weiße Milzpulpa

Entgegen früheren Publikationen durch Cyster et al. [52] zeigten sich in unseren Versuchen mit immunhistologischer Darstellung der weißen Milzpulpa durch MOMA-Antikörper (vergleiche Kapitel 3.9.3) keine wesentlichen Unterschiede in

der Menge und Verteilung von CD4⁺ T-Lymphozyten innerhalb der Milz. Cyster et al. berichteten, dass durch Pertussistoxinwirkung eine Unterdrückung der T-Zellakkumulation innerhalb der Milz erreicht würde. Dies sollte Erklärung für eine verstärkte Krankheitsinduktion durch die vermehrt zirkulierenden Zellen sein. Passend zu unseren histologischen Ergebnissen der MOMA-Färbung ist die Vermutung, dass die Milz als Station zwischen Lymphknoten und ZNS fungiert. Wie im folgenden Abschnitt diskutiert wird, finden wir, vollkommen im Gegensatz zu Cyster et al., eine stete Zunahme der antigenspezifischen lymphatischen Zellen in der Milz. Diese Beobachtung legt im weiteren die Frage nahe, ob die Milz nur als Zwischenstation der „Zellwanderung zum ZNS“ auftritt oder ob in der Milz ferner wichtige Veränderungen am Phänotyp der Zelle stattfinden, die für die Autoimmunität im ZNS verantwortlich sind.

4.3.2. PTX führt innerhalb der Milz zur erhöhten Gesamtzellzahl von Lymphozyten, T-Helfer-Zellen und PLP-spezifischen CD4⁺ Zellen

Betrachtet man die Populationsdynamik sämtlicher Immunzellen in der Milz, so fällt auf, dass neben der Gesamtpopulation aller lymphatischer Zellen, auch die Subpopulationen (CD4⁺, Tm-PLP⁺/CD4⁺) innerhalb der Gruppe mit PTX Gabe einen signifikanten Anstieg um Tag 4 zeigen. Auch wenn prozentual in beiden Gruppen CD4⁺ Zellen einen ähnlich großen Anteil der Gesamtlymphozyten von ca. 20-25 % ausmachen, sticht die um 30% höhere Anzahl PLP-spezifischer CD4⁺ Zellen heraus.

Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Verteilung antigenspezifischer T-Zellen in der zeitlichen Dynamik der EAE zeigten Hofstetter et al. [84] für die Milz im Modell der EAE mit MBP. Im Unterschied zu unserer Technik wurde hier mittels IFN- γ ELISPOT gezeigt, dass bei zunächst 3 Spots (Millionen) spezifischen Zellen vor Immunisierung eine Zunahme auf 87 bis 137 Spots (Millionen) stattfand. Aufgrund der Tatsache, dass die Popliteallymphknoten der Milz schon aufgrund des anatomischen Kreislaufs vorgeschaltet sind, ist davon auszugehen, dass zunächst Zellen aus den Lymphknoten in die Milz eingewandert sind. Ebenfalls zeigt sich hier, unabhängig vom zahlenmäßigen Unterschied der beiden Versuchsgruppen, der um 2 Tage früher eintretende Höhepunkt in der Gruppe mit PTX. Zum Zeitpunkt des Maximums in der Milz muss beim Ver-

gleich mit den Zellzahlen der Lymphknoten neben Zunahme durch Migration auch eine Vermehrung der Zellen innerhalb der Milz stattgefunden haben. Vergleichend zwischen beiden Versuchsgruppen zeigen hingegen die Aktivitätsmarker CD44 und CD69 keine kennzeichnenden Unterschiede. Nimmt man Wachstums- und Aktivierungsverhalten der Immunzelle zusammen, so scheint die Milz nicht als einfaches „Zwischenlager“ auf dem Weg zum ZNS zu dienen. Auch wenn wir in Bezug auf Aktivierungsverhalten keine Unterschiede aufzeigen konnten, ist die Tatsache einer Zellpopulation Zeichen einer deutlichen Einflussnahme auch auf die einzelne Zelle. Interessant wird hier in Zukunft die Analyse weiterer Phänotypisierungsmarker zur Klassifikation der einzelnen Zelle innerhalb der Milz sein.

4.3.3. CD4+ und PLP-spezifische CD4+ Zellen wandern unter PTX Gabe von der Milz ins ZNS

Interessanterweise zeigt sich parallel zum Erkrankungsbeginn der Versuchstiere mit PTX eine deutliche Abnahme der Lymphozytenpopulationen in der Milz. Deutlich wird dies vor allem zwischen den Tagen 12 und 14 innerhalb der CD4+ und der Tm-PLP+/CD4+ Zellen. Hingegen zeigen nicht erkrankte Mäuse eine konstante, zum Teil sogar ansteigende Zellzahl in der Milz. Dies legt nahe, dass ab Krankheitsbeginn an Tag 10 Zellen aus der Milz in Richtung ZNS wandern. Das entspricht dem Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von PLP-spezifischen CD4+ Zellen im Gehirn. Rückblickend auf die oft gestellte Hypothese einer PTX-Wirkung allein an der Blut-Hirn-Schranke muss man hier die Frage stellen, woher eine Immunzelle in der Milz kurz vor Krankheitsbeginn an Tag 8 oder 10 das Signal einer „geöffneten“ Blut-Hirn-Schranke bekommen soll. Zwar lässt sich hiermit eine Wirkung bezüglich der zerebralen Gefäßpermeabilität nicht ausschließen, vielmehr legt es aber peripher stattfindende Mechanismen einer PTX-Wirkung nahe. Vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Zelldynamik zwischen Milz und ZNS beschreiben auch Bischof et al. [76].

4.4. PLP-spezifische T-Helfer-Zellen im ZNS zeigen CD44+/CD69+ Phänotyp

Auffallend an den Ergebnissen des ZNS war die Expression beider Aktivierungsmarker CD44 und CD69.

CD44 wurde ursprünglich als „lymphocyte homing maker“ beschrieben [85]. Studien zeigten, dass CD44 nicht wie ursprünglich gedacht speziell für die Lenkung von Immunzellen zu Lymphknoten zuständig ist, sondern vielmehr Immunzellen an Orte der Entzündung führt. Für die EAE konnte nachgewiesen werden, dass eine Hemmung des CD44 Moleküls durch einen spezifischen Antikörper den Erkrankungsgrad verringern, wenn nicht sogar die Erkrankung komplett zu verhindern vermag [83, 86, 87].

Analysiert man T-Helfer-Zellen im ZNS auf CD44, so findet man eine nahezu konstitutive Expression des Moleküls mit Erscheinen der Zellen intrazerebral an Tag 10. Da sich die Präsentation von CD44 nach dem Aktivierungszeitpunkt erst langsam entwickelt beziehungsweise aufbaut (als Beispiel dienen hierfür die Phänotypisierungsdaten aus den Popliteallymphknoten), muss davon ausgegangen werden, dass sämtliche CD4+ Lymphozyten im ZNS dieses Molekül schon vor Eintritt durch die Blut-Hirn-Schranke exprimieren.

Sicherlich ist CD44 nicht das einzige Molekül, welches für einen Übertritt ins ZNS ausschlaggebend ist. Tatsache bleibt jedoch, dass CD44 für die Migration der Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke notwendig zu sein scheint [87].

Die Expression des „early activation antigens“ CD69 zeigt hier ein etwas anderes Verhalten. Unspezifische CD4+ Zellen unterscheiden sich von Tm-PLP+ durch eine zu Beginn deutlich niedrigere Expression, welche sich erst langsam steigert. Hingegen zeigen Tm-PLP+/CD4+ Zellen eine konstante Expression von 80%. Zieht man auch hier den Vergleich zum peripheren Aktivierungsniveau so fällt auf, dass dieses deutlich niedriger liegt. Erklärbar ist dieses Verhalten durch einen erneuten Antigenkontakt im ZNS, wodurch eine wiederholte Aktivierung der antigenspezifischen Zellen erfolgt. Aufgrund des raschen Markeranstiegs des CD69 Proteins („early activation antigen“) sind antigenspezifische Zellen zu Beginn des ZNS-Eintritts schon auf hohem Niveau. Zudem

macht sich die Antigenspezifität der Aktivierung durch die niedrigere CD69-Expression der unspezifischen CD4+ Zellen deutlich.

Graphisch untermauert die immunhistologische Aufarbeitung von ZNS-Läsionen (vergleiche Abb. 42, Abb. 43, Abb. 44) nochmals das Expressionsmuster der Moleküle CD4 und CD44 passend zu den Ergebnissen der Durchflußzytometrie. Erwartungsgemäß sind CD4+ Zellen innerhalb der zerebralen Läsionen konzentriert. Allerdings scheint sich die Entzündungsreaktion nicht allein auf die fokalen Herde zu beschränken; charakteristisch finden sich in der näheren Umgebung der Läsion einzeln verstreute CD4+ Zellen. Dies spricht für eine zum Teil doch deutlich ausgeprägte Umgebungsreaktion des Entzündungsgeschehens. Bemerkenswert zeigt sich hier auch das deutliche Verhältnis der CD4+ Zellen zu Ungunsten der CD8+ Zellen, welche hier nur am Rand erwähnt sein sollen. Insbesondere CD8+ Zellen zeigen ein flächiges Ausbreitungsmuster um den Entzündungsherd. Vergleichend mit der Krankheitsausprägung vermag die Interpretation einer ausgeprägten Umgebungsreaktion ohne zahlenmäßiges Überwiegen von Immunzellen die oft einschneidenden Krankheitssymptome zu erklären.

4.5. CD 40 Ligand – Kostimulatorisches Molekül oder Vermittler ins ZNS

CD40 Ligand (CD154) steht ebenfalls als Molekül im Kreis der Aktivierungsmarker. Gegenspieler ist das CD40 Molekül, welches konstitutiv auf B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert wird [88, 89]. Neben vielen einzelnen Funktionen von CD40L sind insbesondere die Aktivierung von B-Zellen (Produktion von Immunglobulinen) und antigenpräsentierenden Zellen als Effektor-Komponente [90] ebenso wie die Interaktion mit Endothelzellen zur Extravasation von Lymphozyten zu nennen [91, 92]. Darüber hinaus zeigten Experimente durch Howard et al. [88, 91], dass durch Antikörperblockade des CD40L/CD40-System ein Ausbruch der EAE hinausgezögert oder sogar verhindert werden kann.

Da sich sowohl Ansätze in Richtung einer kostimulatorischen Funktion als „Effektorvermittler“ als auch in Richtung einer Wirkung am Gefäßendothel aus der

Literatur ergaben, interessierte uns die Wirkung von PTX bezüglich der Expression dieses Moleküls peripher und zentral. Interessanterweise ergab sich in Lymphknoten und Milz ein gänzlich unspektakulärer Verlauf mit sehr niedriger Expression und nur angedeuteter Dynamik analog der anderen Aktivierungsmarker. Nach Eintritt der antigenspezifischen Zellen in das ZNS zeigen diese ein auffallend hohes Expressionsniveau mit 30 bis 40%. Hierbei zeigte sich wie zuvor bei CD69 ein markanter Unterschied mit niedrigerer Expression in unspezifischen CD4+ Zellen. Betrachtet man in diesem Zusammenhang erneut die Funktion dieses Moleküls, so stimmt die Expression von CD40L sowohl mit der Funktion als Effektorkomponente im Zusammenspiel mit anderen Immunzellen als auch mit dem Vorgang der Extravasation über die Blut-Hirn-Schranke überein. Dass es sich bei dieser Immunreaktion um ein spezifisches Verhalten der Zellen handelt, wird aufgrund des Unterschiedes der CD40L Expression zu unspezifischen CD4+ Zellen deutlich. Die Expressionsabnahme lässt sich neben einer Abnahme des Aktivierungsstatus durchaus auch durch die im Folgenden beschriebenen Apoptosemechanismen erklären. Die Rolle von CD40L im Rahmen der Lymphozytenmigration ins ZNS ist auch konsistent mit den Ergebnissen der CD44 Phänotypisierung. Offen bleibt allerdings, warum im Vergleich zu CD44 nur ein Drittel der PLP-spezifischen CD4+Zellen CD40L exprimieren. Entsprechend unseren Daten berichteten Issazadeh et al. [89] einen ersten immunhistologischen Nachweis von CD40L im ZNS zum Zeitpunkt des akuten Krankheitsgeschehens. Nach konstanter Phase im Rahmen der Remission ergab sich eine umso höhere Expression nach erneutem Krankheitsausbruch. Aufgrund unseres zeitlich limitierten Modells kann zu dieser Auffälligkeit keine Aussage getroffen werden. Hier könnten in Zukunft länger dauernde Studien Aufschluss bringen.

4.6. Konstitutive Expression von CD95 (Fas) auf CD4+ Zellen - Definition einer Population CD95high

Unsere Versuche zeigten, dass CD95 auf sämtlichen CD4+ Zellen konstitutiv exprimiert wird. Es zeigten sich hier keinerlei Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen oder den untersuchten Organen. Vergleichbare Daten

im Bezug auf eine flächendeckende Expression von CD95 berichten Dittel et al. [93] für T-Zelllinien MPB-transgener Mäuse.

Im Wechselspiel von Population und Apoptose ist eine dauerhafte Expression von Fas verständlich; durch Vorhandensein von Fas besteht die Möglichkeit, dass von außen getriggert Apoptose induziert werden kann [94]. Es stellt sich im Folgenden die Frage ganz unabhängig von anderen Signalwegen der Apoptose, ob jede Fas-exprimierende Zelle für diesen Apoptosetransduktionsweg gleich „anfällig“ ist. Natürlich muss man davon ausgehen, dass es sicherlich quantitative Unterschiede betreffend der intrazellulären Informationsweitergabe nach CD95 gibt - auffällig zeigte sich jedoch bei uns, dass sich zusätzlich zur regelhaften Expression auf der T-Helfer-Zelle eine Überexpression (im Weiteren als CD95^{high} bezeichnet) darstellen lässt. Bonetti et al. [95] konnten ebenfalls den Vorgang einer Zunahme der CD95-Expression für das intrazerebrale T-Zell-Repertoire zeigen. Unabhängig von jeglicher Dynamik spiegelten auch unsere immunhistologischen Ergebnisse das grobe Verteilungsmuster von CD95 speziell in den zerebralen Läsionen.

Betrachtet man die Auswertung dieser mit CD95^{high} überschriebenen Population, so finden sich Parallelen zum Verlauf der Aktivierungsmarker. In den Lymphknoten wird bei PTX-Gabe ein früherer und zudem ausgeprägterer Höhepunkt erreicht als in der Kontrollgruppe. Weiter zeigt die Kinetik in der erkrankten Gruppe einen deutlichen Abfall. Ist dieses Phänomen nun Ausdruck einer Aktivierung oder vielmehr Reaktion auf die Aktivierung der einzelnen Zelle? Anhand der vorliegenden Daten kann diesbezüglich nicht unterschieden werden. Allerdings legt die Tatsache, dass die Hauptaufgabe des Fas-Monomers im Bereich der Apoptosevermittlung liegt, eher die zweite Hypothese nahe.

Beobachtet man neben den Lymphknoten die CD95^{high} Expression im ZNS, so findet man hier ebenso hohe Level wie zum Zeitpunkt der stärksten Aktivierung peripher. Interpretieren lässt sich dies im Vergleich zur CD40L Expression, dass auch hier beim erneuten Antigenkontakt (im Rahmen der Effektorfunktion) mit der wiederum maximal hohen Aktivierung eine Hochregulation des Fas-Proteins auf der Zelloberfläche stattfindet. Welches Ziel hat diese Sensibilisierung der T-

Zelle für Apoptose im Rahmen einer Aktivierungsreaktion? Die folgenden Kapitel fokussieren weiter auf diesen Übergang von Aktivierung zu Apoptose.

4.7. CD95 Ligand (Fas Ligand) – Effektormechanismen im ZNS

CD95 Ligand, auch bekannt als Fas Ligand, ist der Interaktionspartner des Fas Moleküls im Apoptosemechanismus. Das Molekül stammt aus dem Kreis der Rezeptoren für Tumor Nekrose Faktor [94]. Fas Ligand, ob in membrangebundener oder löslicher Form [65], ist in der Lage, in benachbarten Zellen sowie in der eigenen Zelle (im Rahmen eines Zellsuizids) über die Interaktion mit dem Fas-Rezeptor einen Signalweg anzustoßen, der schließlich über die Aktivierung von Caspasen zur programmierten Zellestörung führt.

Unsere Daten zeigen, dass eine Einflussnahme von Fas Ligand vor allem im ZNS stattfinden muss. In peripheren Organen zeigten sich nur niedrige Expressionswerte mit spärlicher Dynamik. Eine überproportionale Expression zeigte sich mit etwa 40 % erst im ZNS erkrankter Mäuse. Ein direkter Einfluss von PTX auf die periphere Verteilung beider Gruppen war nicht festzustellen.

Konsistent mit unseren Daten zeigten auch Bonetti et al. [95] für das T-Zellrepertoire aus ZNS-Isolaten erkrankter Mäuse (MBP-EAE) eine Zunahme der Fas Ligand Expression. Ein direkter Nachweis auf CD4+ Zellen im ZNS wurde immunhistochemisch durch Ouallet et al. erbracht und mit etwa 60% Expression beschrieben [96].

Mehrere Autoren beschreiben auch eine Fas Ligand Expression auf dem ortsständigen Parenchym (Green et al. [65] am Beispiel der Darmepithelien, Ouallet et al. im ZNS an Gliazellen und Neuronen). Somit ist eine Induktion von Apoptose nicht nur durch Effektorzellen im Parenchym oder in Immunzellen möglich, sondern auch durch ortsständige Parenchymzellen.

Auf welche Art und Weise PLP-spezifische Zellen Effektormechanismen im ZNS ausüben, bleibt offen. Nimmt man die Ergebnisse der Phänotypisierung bezüglich CD40L, CD95 und CD95 Ligand zusammen, so liegt nahe, dass zum Zeitpunkt des zweiten Antigenkontaktes, welcher gleichzeitig zur Ausprägung der Erkrankung führt, Abläufe im ZNS stattfinden, bei denen T-Helfer-Zellen in Interaktion mit Zellen des Hirngewebes und auch des Immunsystems stehen.

Speziell die Kombination von CD40L und CD95L soll nach Rathmell et al. [97] ausgehend von T-Zellen, reguliert durch den B-Zellrezeptor, sowohl zur klonalen Expansion, als auch zur Deletion von B-Lymphozyten führen.

4.8. Activation induced cell death (AICD) – ein mögliches Modell zur Erklärung der Fas/Fas Ligand-Induktion nach Aktivierung

Eine mögliche Erklärung für die rasche Hochregulation des Fas/Fas Ligand Systems nach Aktivierung der CD4+ Zellen ist die Theorie des „activation induced cell death“. Im Rahmen der Immunreaktion auf ein Antigen kommt es im Organismus, wie unsere Populationsdynamik zeigt, zur starken klonalen Expansion spezifischer und unspezifischer Immunzellen. Hat die jeweilige Zelle ihre Aufgabe erfüllt, muss man sich fragen, was mit dieser Zelle anschließend geschieht. Schließlich zeigen unsere Analysen, dass speziell auch im ZNS nach Erreichen des Maximums der Zellzahl diese sofort wieder zu sinken beginnt. Der Körper muss also Möglichkeiten aufweisen, genau diese Zellen ebenso schnell wieder zu eliminieren. Das Modell des „activation induced cell death“ bietet eine plausible Erklärung, wie der Organismus dieses Problem angeht. Nach Population und Expansion der Immunzellen erfolgt als Konsequenz der Aktivierung eine Induktion des programmierten Zelltodes [65, 94, 98]. So ist es möglich, dass noch am Ort des Geschehens, während der florierenden Immunreaktion, die Deletion der riesigen Lymphozytenpopulation einsetzt. Vielmehr stellt sich also nicht mehr die Frage nach dem konkreten Ort einer Immunzell-elimination, sondern vielmehr die Frage, wann und wo eine Zelle zum einen aktiviert wurde, und zum anderen ihre Aufgabe erfüllt hat.

Erste wenige Untersuchungen unsererseits nach Orten der Elimination, wie zum Beispiel Thymus oder axilläre Lymphknoten (die sich ebenfalls oft deutlich vergrößert darstellten), konnten keine spezifischen Zellen in Apoptose nachweisen (Daten nicht gezeigt). Die Möglichkeit mittels Annexin V Zellen in frühapoptotischem Zustand nachzuweisen, konnte hier zur parallelen Analyse eines möglichen „activation induced cell death“ verwendet werden [67].

Schon im Lymphknoten einer Maus mit PTX fällt überraschend auf, dass eine massive Zunahme der Annexin V-bindenden Zellen zum Zeitpunkt der maxima-

len Aktivierung auftritt. Deutlich wird dies vor allem auch durch die Tatsache, dass unspezifische Zellen weniger stark der frühapoptischen Phase zuzuordnen sind. Hier wird klar, dass schon zu Beginn der Immunreaktion, also zu einem Zeitpunkt ohne Läsionen im ZNS, Lymphozyten in den kontrollierten Zelltod geschickt werden. Leider repräsentiert sich diese Reaktion der Zellen nicht in der Anzahl spätapoptischer/nekrotischer (PI+/Annexin V+) Zellen im Lymphknoten wieder. Nebst Messungenauigkeiten der PI-Färbung muss auch diskutiert werden, dass Zellen zwar im Lymphknoten in die Apoptosesequenz eintreten, endgültig womöglich aber an ganz anderer Stelle „absterben“ und eliminiert werden. Eine weitere Theorie hierzu ist, dass Zellen, sobald sie einen gewissen Punkt der Apoptose überschritten haben, so rasch eliminiert werden, dass es zu keiner messbaren Akkumulation kommt.

Die zuvor beschriebene Wirkung von PTX auf das Aktivierungsverhalten macht sich auch hier wieder deutlich. Bei Mäusen ohne PTX findet sich nur ein zögerlicher Anstieg der frühapoptischen Zellen mit spätem Maximum. Ob dies Auswirkung auf ein weiteres Verhalten der verbliebenen Zellen hat, bleibt im Raum stehen.

Durchweg hohe Annexin V-Bindung beider Versuchsgruppen in der Milz lassen sich nur schwer in die Theorie der aktivitätsbedingten Apoptose eingliedern. Auch in der Milz findet man nur wenige spätapoptische Zellen mittels Parallelanalyse von Annexin V und PI. Die Tatsache, dass die Milz als Organ der Zellsäuberung fungiert, kann auch hier die oben genannte Hypothese einer extrem raschen, definitiven Eliminierung nach eingeleiteter Apoptose untermauern. Möglich wäre auch die Überlegung, dass wenigstens zum Teil frühapoptische Zellen aus den Lymphknoten in die Milz wandern und somit hier als Annexin V+ gemessen werden. Im Gegensatz dazu steht aber die in 4.3 aufgeführte Annahme, dass innerhalb der Milz eine zusätzliche Proliferation von PLP-spezifischen Zellen stattfindet.

Zutreffender zeichnet sich die durch Aktivierung induzierte Apoptose im ZNS ab: Sämtliche PLP-spezifische CD4+ Zellen im ZNS sind von Beginn an mit ansteigender Tendenz dem frühapoptischen Stadium zuzuordnen. Gleichzeitig finden sich auch hier erstmals messbare Zahlen an spätapoptischen bezie-

ungsweise nekrotischen CD4+ Zellen. Die mangelnde Anzahl an phagozytierenden Zellen (Mikroglia) im Vergleich zur Peripherie könnte hier das Verbleiben von Zellen im späten Apoptosestadium erklären. Ein komplexes Zusammenspiel mit Effektormechanismen (Destruktion von Parenchym mit Krankheitssymptomen), Interaktionen mit anderen Immunzellen (zum Beispiel B-Zellstimulation) und rückkoppelnde Wirkungen auf die eigene Zellfunktion scheint für die einzelne Zelle im „activation induced cell death“ zu enden.

Kehrt man an dieser Stelle nochmals zum Fas/Fas Ligand-System zurück, so spricht vieles dafür, dass dieses System in der Regulation der Apoptose im Rahmen des inflammatorischen Prozesses einen bedeutenden Platz einnimmt. Pender [99] und Sabelko-Downes et al. [100] beschreiben die Aufgabe dieses Systems innerhalb des „activation induced cell death“ mit zwei Charakteristika: Erstens Regulation und zweitens Eliminierung von Parenchym- beziehungsweise Effektorzellen.

4.9. Weiterentwicklung des Projektes - Möglichkeiten einer therapeutischen Intervention in der Zukunft

4.9.1. Erneute periphere Populationsdynamik während der Erkrankungsphase

Nicht eingegangen wurde bis jetzt auf die Tatsache, dass sämtliche Analysen der Zellzahlen in peripheren Organen einen erneuten Anstieg zum Tag 20 hin aufweisen. Folglich zu einem Zeitpunkt, an dem die Mäuse den ersten Krankheitshöhepunkt überwunden haben. Dass es sich bei der von uns mit PLP induzierten EAE um eine zyklisch verlaufende Erkrankung handelt, wurde in der Einleitung beschrieben. Ob der erneute Ausbruch beziehungsweise Rückfall der Erkrankung innerhalb des Organismus rein intrazerebral gesteuert verläuft oder ob periphere Immunmechanismen mit erneutem Eintritt von Zellen ins ZNS hierfür eine wichtige Rolle spielen, ist eine interessante Fragestellung. Der erste Hinweis eines wiederkehrenden PLP-spezifischen Zellwachstums innerhalb von Lymphknoten und Milz in den ausgewerteten Daten könnte Grundlage weiterer Untersuchungen der zuvor genannten Theorie sein. Hintergrund dieser erneuten Zellpopulation muss ein Antigenkontakt sein, wenn auch dieser anhand

unserer Daten nicht so spezifisch stimuliert wie zu Beginn einer Induktion. MacKenzie-Graham et al. [101] entdeckten, dass innerhalb eines erneuten Erkrankungsschubes bei MBP-induzierter EAE in Lymphknoten durch Makrophagen ein MBP-ähnliches Antigen präsentiert wird. Studien zur Antigenpräsentation in Popliteallymphknoten zum Zeitpunkt vor und während des zweiten Krankheitsschubes könnten hier weiter Aufschluß erbringen.

4.9.2. Weitere Phänotypisierung PLP-spezifischer CD4+ Zellen

Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bezüglich der Phänotypisierung PLP-spezifischer CD4+ Zellen zeigten, dass PTX zur Th1-Differentierung von T-Helfer-Zellen führt. Vorbeschrieben ist dies durch Hou et al. für dendritische Zellen [102]. Hier bietet sich mit der Durchführung einer weitergehenden Phänotypisierung, auch unter Berücksichtigung regulatorisch wirksamer T-Zellen (CD4+/CD25+, Nachweis von Foxp3-RNA [10]), die Möglichkeit zur Identifikation von Untergruppen der PLP-spezifischen CD4+ Zellen mit kennzeichnenden Zellfunktionen an.

4.9.3. Therapiestrategien

Ziel einer jeden therapeutischen Intervention ist es, so spezifisch wie möglich das gewünschte Ziel zu erreichen, um damit nicht unnötig weitere Teile des Immunsystems zu beeinflussen. Durch Charakteristika wichtiger Untergruppen der spezifischen T-Zellen könnten sich in der Zukunft gezielt wirkende Therapeutika entwickeln lassen.

Der oben beschriebene Sachverhalt einer durchgehenden CD44 Expression auf inflammatorischen Zellen im ZNS konnte im Tiermodell in eine therapeutische Strategie umgesetzt werden. Durch Gabe eines Antikörpers gegen das CD44 Protein auf der Zelloberfläche konnte die Entwicklung einer EAE mit typischen intrazerebralen Läsionen unterbunden werden [83]. Ähnlich diesem Prinzip konnten Zhu et al. durch intrathekale Gabe eines Fas Ligand Antikörpers die Ausprägung der EAE verringern oder diese sogar ganz verhindern [103]. Die Arbeitsgruppe gelangte zur Überzeugung, dass durch Fas Ligand Antikörper ins ZNS eindringende Immunzellen zur Apoptose gebracht werden.

Gelingt es, unter Anwendung der wachsenden Kenntnisse über Autoimmunitätsentwicklung therapeutische Optionen gegen spezifische Subklassen an T-Zellen zu entwickeln, so könnte in Zukunft gezielter gegen Autoimmunerkrankungen vorgegangen werden.

5. Zusammenfassung

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) gilt als Modellerkrankung der Multiplen Sklerose und stellt eine Forschungsgrundlage zur Aufklärung von Mechanismen organspezifischer Autoimmunerkrankungen dar. SJL-Mäuse entwickeln nach Immunisierung mit einem Peptid des Proteolipid Protein (PLP139-151), einem Bestandteil des Myelins im zentralen Nervensystem (ZNS), eine chronische EAE, die dem Verlauf einer schubförmig-remittierenden Multiplen Sklerose nahe kommt. Dies beruht auf der Aktivierung und Expansion präexistenter, im Immunrepertoire natürlicherweise vorhandener PLP139-151-spezifischer T-Zellen. Unter Verwendung von rekombinanten, oligomerisierten MHC-Klasse II Molekülen, die mit PLP139-151 beladen sind (sog. MHC-Klasse II-Tetramere) lassen sich CD4+ Antigen-spezifische T-Zellen ohne vorherige Manipulation ex vivo im Gewebe und im zirkulierenden Blut detektieren. Mit dieser neuartigen und hochspezifischen Methode wurden im Verlauf der EAE detaillierte Untersuchungen zur Populationsdynamik Antigen-spezifischer CD4+ T-Helfer-Zellen in Lymphknoten, Milz und ZNS durchgeführt und Veränderungen ihres Phänotyps nach Durchwanderung der Blut-Hirnschranke im ZNS quantitativ erfasst. Abschließend wurde die Frage verfolgt, auf welchem Weg diese T-Helfer-Zellen nach Erfüllung ihrer Effektorfunktion wieder eliminiert werden.

Nach der Immunisierung mit PLP139-151 entwickelten nur die Tiere Krankheitssymptome einer EAE, die zusätzlich Pertussistoxin (PTX) erhalten hatten. Ohne PTX waren nur vereinzelt CD4+ T-Zellen im ZNS nachweisbar. PTX führte bereits in der Peripherie (Lymphknoten und Milz) zu einer rascheren Expansion PLP-spezifischer CD4+ T-Zellen und zu einer früheren und verstärkten Expression von Aktivierungsmerkmalen wie CD69 (very early activation marker) und dem Zelladhäsionsmolekül CD44 (pgp-1, homing cell adhesion molecule). Unter den in das ZNS eingewanderten Zellen stellten die in der Tetramerfärbung nachweisbaren PLP139-151-spezifischen T-Zellen mit etwa 15.000 Zellen nur eine Minderheit von etwa 5% aller CD4+ T-Zellen im ZNS dar. Alle Zellen im ZNS exprimierten den *homing receptor* CD44 und nach Durchtritt durch die

Blut-Hirnschranke verstärkt das Merkmal CD69 als Hinweis für einen erneuten Antigenkontakt. Parallel zum Anstieg der Aktivierungsparameter wurde eine verstärkte Expression der Apoptose-induzierenden Moleküle Fas und Fas-Ligand auf der Zellmembran von CD4⁺ T-Lymphozyten gefunden. Der Nachweis AnnexinV-positiver T-Zellen wies darauf hin, dass die infiltrierten T-Zellen im Verlauf der EAE den Weg der Apoptose einschlagen und autoreaktive T-Zellen somit nach Auslösung eines Krankheitsschubes im ZNS wieder eliminiert werden. Dieses als „activation induced cell death“ bezeichnete Phänomen wurde unter den PLP139-151-spezifischen T-Zellen lediglich im ZNS, nicht aber in den Lymphknoten oder in der Milz beobachtet.

Diese Untersuchungen zur Dynamik einer autoreaktiven T-Zell-Population im Krankheitsverlauf der EAE sollten therapeutisch relevante Schlüsselpositionen identifizieren und zur Entwicklung neuer Therapiestrategien bei Autoimmunerkrankheiten wie der Multiplen Sklerose beitragen.

III Abbildungen

Abb. 1:	T-Zell-Subpopulationen [3]	7
Abb. 2:	Vereinfachtes Krankheitsmodell der EAE [7, 35]	13
Abb. 3:	Aufbau der cDNA Konstrukte zur Herstellung von Tetrameren rekombinanter Peptid/MHC Klasse II Komplexe.....	33
Abb. 4:	Schematischer Aufbau eines fertigen Peptid/MHC Klasse II-Tetra- mers.....	33
Abb. 5:	Ergebnis nach Dichtezentrifugation	38
Abb. 6:	Strukturformel von Propidiumjodid.....	40
Abb. 7:	Datensatz eines Lymphknoten einer Maus 6d nach Immunisierung: FSC -SSC-Diagramm (a), CD4-PI-Diagramm (b), CD4-Tm-PLP- Diagramm Auflösung 128 (c), CD4-Tm-PLP-Diagramm Auflösung 256 (d)	44
Abb. 8:	Datensatz eines Lymphknotens einer Maus d6 nach Immunisierung in 256-er Auflösung (a) und 128-er Auflösung (b); Datensatz eines Lymphknotens einer nicht immunisierten Maus (d0) (c); phänotypische Auswertung spezifischer und unspezifischer Lymphknotenzellen einer Maus 6d nach Immunisierung bezüglich des Markers CD44 (d,e)	45
Abb. 9:	Diagramm zeigt die mittlere Krankheitsausprägung (MDS) in den beiden Versuchsgruppen über 50 Tage nach Immunisierung	52
Abb. 10:	HE-Histologie von nicht immunisierten Mäusen (d0) aus folgenden Bereichen: Kleinhirn (a und b, Maßstab = 500 µm), Rückenmark zervikaler Querschnitt (c, Maßstab = 200 µm), Rückenmark thorakaler Längsschnitt (d, Maßstab = 500 µm)	55
Abb. 11:	HE-Histologie von immunisierten Mäusen mit PTX-Gabe (d14) aus folgenden Bereichen: Hirnstamm (a und b, Maßstab = 500 µm), zentrales Großhirn(c, Maßstab = 500 µm), Hirnstamm (d, Maßstab = 50 µm)	56
Abb. 12:	HE-Histologie von immunisierten Mäusen mit PTX-Gabe (d14) aus folgenden Bereichen: Kleinhirn/-stil (a und b, Maßstab = 500 µm), Großhirnperiventriculär (c und d, Maßstab = 100 µm)	57

Abb. 13: HE-Histologie von immunisierten Mäusen mit PTX-Gabe (d14) aus folgenden Bereichen: Distales Rückenmark Längsschnitt (a, Maßstab = 200 µm), distales Rückenmark Längsschnitt (b, Maßstab = 100 µm), proximales Rückenmark Querschnitt (c, Maßstab = 200 µm), proximales Rückenmark Querschnitt (d, Maßstab = 100 µm).....	58
Abb. 14: HE-Histologie von immunisierten Mäusen ohne PTX-Gabe (d14) aus folgenden Bereichen (Maßstab = 500 µm) : Hirnstamm zentral (a), Frontalhirn (b), Kleinhirn mit Anschnitten von Hirnstamm und Kleinhirnstiel (c und d)	59
Abb. 15: HE-Histologie von immunisierten Mäusen ohne PTX-Gabe (d14) aus folgenden Bereichen: Proximales Rückenmark längs (a, Maßstab = 500 µm), Rückenmark längs (b, Maßstab = 200 µm), Rückenmark quer (c, Maßstab = 200 µm), Rückenmark quer (c, 100 µm).....	59
Abb. 16: Gesamtzellzahl in den Organen Lymphknoten (a), Milz (b) und ZNS 8 (c) bis zu 20 Tage nach Immunisierung.....	60
Abb. 17: Auswertung der Gesamtzellzahl der CD4+ Zellen in den Organen Lymphknoten (a), Milz (b) und ZNS 8 (c) bis zu 20 Tage nach Immunisierung.....	62
Abb. 18: Auswertung der Gesamtzellzahl der Tm+/CD4+ Zellen (Dreieck = PLP, Kreis = MBP) für Mäuse mit und ohne PTX-Injektion bei Immunisierung in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c+f) bis zu 20 Tage nach Immunisierung.....	65
Abb. 19: Auswertung der relativen Zellzahl der Tm+/CD4+ Zellen (Dreieck = PLP, Kreis = MBP) für Mäuse mit und ohne PTX-Injektion bei Immunisierung in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c+f) bis zu 20 Tage nach Immunisierung.....	65
Abb. 20: Darstellung der LKN-Rohdaten zu folgenden Versuchsansätzen: Maus d0 Tm-PLP/CD4 (a), Maus d6 +PTX Tm-PLP/CD4 (b), Maus d6 +PTX Tm-MBP/CD4 (c), Maus d6 -PTX Tm-PLP/CD4 (d).....	67
Abb. 21: Vergleich der absoluten Zellzahl im LKN zwischen beiden Versuchsgruppen an Tag 6 (a) sowie der relativen Zellzahl an Tag 4 (b).	68

Abb. 22: Darstellung der Milz-Rohdaten zu folgenden Versuchsansätzen: Maus d0 Tm-PLP/CD4 (a), Maus d4 +PTX Tm-PLP/CD4 (b), Maus d4 +PTX Tm-MBP/CD4 (c), Maus d4 –PTX Tm-PLP/CD4 (d).....	70
Abb. 23: Vergleich der absoluten Zellzahl in der Milz zwischen beiden Versuchsgruppen an Tag 4 (a), sowie der relativen Zellzahl an Tag 6 (b).	70
Abb. 24: Darstellung der ZNS-Rohdaten zu folgenden Versuchsansätzen: Maus d0 Tm-PLP/CD4 (a), Maus d10 +PTX Tm-PLP/CD4 (b), Maus d10 +PTX Tm-MBP/CD4 (c), Maus d10 –PTX Tm-PLP/CD4 (d).....	73
Abb. 25: Darstellung der CD44 Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c)	74
Abb. 26: Vergleich der CD44 Expression auf Tm-PLP+ CD4 Zellen zwischen beiden Versuchsgruppen (+PT/-PT) für folgende Versuchsansätze: LKN, d6 (a), LKN, d14 (b) und Milz, d6 (c).....	75
Abb. 27: Darstellung der Rohdatendiagramme für die CD44 Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm- PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)	75
Abb. 28: Darstellung der CD69 Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c)	76
Abb. 29: Darstellung der Rohdatendiagramme für die CD69 Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm- PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)	78
Abb. 30: Darstellung der CD40L Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c)	79

Abb. 31:	Darstellung der Rohdatendiagramme für die CD40L Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm-PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)	80
Abb. 32:	Darstellung der CD95 Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c) (Marker bei 60 bzw. 350 bezogen auf eine Auflösung von 256 bzw. 1024)	81
Abb. 33:	Darstellung der Rohdatendiagramme für die CD95 Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm-PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)	81
Abb. 34:	Darstellung der CD95 „high“ Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c) (Marker bei 111 bzw. 477 bezogen auf eine Auflösung von 256 bzw. 1024)	82
Abb. 35:	Direkter Vergleich beider Versuchsgruppen bezüglich der CD95high Expression auf Tm+/CD4+ Zellen in Lymphknoten 6 Tage nach Immunisierung	82
Abb. 36:	Darstellung der CD95L Expression auf Tm-PLP+ und Tm-PLP- CD4 Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung für beide Versuchsgruppen in den Organen Lymphknoten (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c)	84
Abb. 37:	Vergleich der CD95L Expression aus Abb. 36 mit der Expression von CD95L auf CD4 negativen Zellen im Verlauf von 20 Tagen nach Immunisierung bei Mäusen mit PTX-Injektion in den Organen LKN (a), Milz (b) und ZNS (c)	85
Abb. 38:	Darstellung der Rohdatendiagramme für die CD95L Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm-	

	PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)	85
Abb. 39:	Darstellung der Annexin V positiven Tm+/Tm- CD4 Zellen in den Organen LKN (a+d), Milz (b+e) und ZNS (c) für beide Versuchsgruppen. Zuvor wurden PI+ und somit nekrotische bzw. spät apoptotische Zellen ausgegattet.	86
Abb. 40:	Im Vergleich zu Abb. 39 zusätzliche Darstellung der CD4+/Ann+/PI+ Zellen der Versuchsgruppe mit PTX Injektion in den Organen LKN (a), Milz (b) und ZNS (c)	87
Abb. 41:	Darstellung der Rohdatendiagramme für die Annexin V Expression der Versuchsgruppe mit PTX Injektion für folgende Versuchsansätze (obere Reihe für Tm-PLP-/CD4+ Zellen, untere Reihe für Tm-PLP+/CD4+ Zellen): Lymphknoten d0 (a+d), Lymphknoten d6 (b+e) und ZNS d12 (c+f)	88
Abb. 42:	Immunfluoreszenzhistologie einer immunisierten Maus mit PTX-Gabe (d14) aus dem Kleinhirn: Zellkernfärbung mit DAPI (blau), CD4-FITC (grün) (a: Vergrößerung 50x (Maßstab = 200 µm), b: 100x (Maßstab = 100 µm) und c,d: 200x (Maßstab = 100 µm)	89
Abb. 43	Immunfluoreszenzhistologie einer immunisierten Maus mit PTX-Gabe (d14) aus dem Kleinhirn: Zellkernfärbung mit DAPI (blau), CD4-FITC (grün), CD8-PE (rot) (a,b: Vergrößerung 200x (Maßstab = 200 µm), c: 200x optisch (Maßstab = 50 µm, zusätzlich digital vergrößert).....	90
Abb. 44:	Immunfluoreszenzhistologie einer immunisierten Maus mit PTX-Gabe (d14) aus dem Kleinhirn, Zellkernfärbung mit DAPI (blau): a,b: CD44-FITC (Vergrößerung 50x bzw. 200x, Maßstab = 200 µm bzw. 100 µm), c,d: CD95-FITC (Vergrößerung 200x, Maßstab = 100 µm), e: B220-PE (Vergrößerung 200x, Maßstab = 100 µm), f: Anti-Neurofilament-Cy3 (Vergrößerung 200x, Maßstab = 100 µm).....	91
Abb. 45:	HE-Histologie der Milz von Mäusen d10 nach Immunisierung ohne PTX (a und b) und mit PTX (c und d) (a, b und c Maßstab = 200 µm, d Maßstab = 100 µm)	93
Abb. 46:	Mikroskopische Anatomie der Milz (Abbildung aus [3])	93

- Abb. 47: Immunfluoreszenzhistologie der Milz einer immunisierten Maus ohne PTX-Gabe (d10): Zellkernfärbung mit DAPI (blau), CD4-FITC (grün) und MOMA-Cy3 (anti-metallophilic macrophages) (a: Vergrößerung 50x (Maßstab = 500 µm), b: Vergrößerung 100x (Maßstab = 100 µm), c: Vergrößerung 200x (Maßstab = 100 µm)) 94
- Abb. 48: Immunfluoreszenzhistologie der Milz einer immunisierten Maus mit PTX-Gabe (d10): Zellkernfärbung mit DAPI (blau), CD4-FITC (grün) und MOMA-Cy3 (anti-metallophilic macrophages) (a: Vergrößerung 50x (Maßstab = 500 µm), b: Vergrößerung 100x (Maßstab = 100 µm), c: Vergrößerung 200x (Maßstab = 100 µm)) 95

IV Tabellen

Tab. 1: Laborgeräte	23
Tab. 2: Laborverbrauchsmaterialien	24
Tab. 3: Kommerzielle Medien, Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	26
Tab. 4: Kommerzielle Antikörper	26
Tab. 5: Antikörperverdünnungen	28
Tab. 6: Peptidsequenzen von PLP 139-151 und MBP 84-96	30
Tab. 7: Färbeprotokoll für HE-Histologie	48
Tab. 8: Färbeprotokolle für Immunfluoreszenz an ZNS-Schnitten	50

V Literaturverzeichnis

1. Rivers, T.M., D.H. Sprunt, and G.P. Berry, *Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys*. J Exp Med, 1933. **58**: p. 39-56.
2. Steinman, L., *Multiple sclerosis: a two-stage disease*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 762-4.
3. Janeway, C.A., Jr., et al., *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5 ed. 2001.
4. Renz-Polsterer, H. and J. Braun, *Basislehrbuch Innere Medizin*. 2 ed. 2001.
5. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 305-34.
6. Monney, L., et al., *Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 536-41.
7. Kuchroo, V.K., et al., *T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 101-23.
8. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
9. Sakaguchi, S., *Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors*. J Exp Med, 2003. **197**(4): p. 397-401.
10. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
11. Jenkins, M.K., et al., *In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 23-45.
12. Noseworthy, J.H., et al., *Multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2000. **343**(13): p. 938-52.
13. Zamvil, S.S. and L. Steinman, *Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis*. Neuron, 2003. **38**(5): p. 685-8.
14. Mumenthaler, M. and H. Mattle, *Neurologie*. 11 ed. 2002.
15. Wucherpfennig, K.W. and J.L. Strominger, *Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein*. Cell, 1995. **80**(5): p. 695-705.
16. Horwitz, M.S., et al., *Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 781-5.

17. Prat, E. and R. Martin, *The immunopathogenesis of multiple sclerosis*. J Rehabil Res Dev, 2002. **39**(2): p. 187-99.
18. Steinman, L., *Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system*. Cell, 1996. **85**(3): p. 299-302.
19. Kantarci, O.H., M. de Andrade, and B.G. Weinshenker, *Identifying disease modifying genes in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2002. **123**(1-2): p. 144-59.
20. Berger, T., et al., *Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event*. N Engl J Med, 2003. **349**(2): p. 139-45.
21. Sun, D. and H. Wekerle, *Ia-restricted encephalitogenic T lymphocytes mediating EAE lyse autoantigen-presenting astrocytes*. Nature, 1986. **320**(6057): p. 70-2.
22. Neumann, H., et al., *Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases*. Trends Neurosci, 2002. **25**(6): p. 313-9.
23. Jacobsen, M., et al., *Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients*. Brain, 2002. **125**(Pt 3): p. 538-50.
24. Babbe, H., et al., *Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction*. J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 393-404.
25. Genain, C.P., et al., *Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis*. Nat Med, 1999. **5**(2): p. 170-5.
26. Archelos, J.J., M.K. Storch, and H.P. Hartung, *The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2000. **47**(6): p. 694-706.
27. Trebst, C., et al., *CCR1+/CCR5+ mononuclear phagocytes accumulate in the central nervous system of patients with multiple sclerosis*. Am J Pathol, 2001. **159**(5): p. 1701-10.
28. Andersson, P.B. and D.E. Goodkin, *Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: a critical review*. J Neurol Sci, 1998. **160**(1): p. 16-25.
29. Boumpas, D.T., et al., *Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates*. Ann Intern Med, 1993. **119**(12): p. 1198-208.
30. Wekerle, H., et al., *Animal models*. Ann Neurol, 1994. **36** Suppl: p. S47-53.
31. Schluesener, H.J. and H. Wekerle, *Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations*. J Immunol, 1985. **135**(5): p. 3128-33.
32. Owens, T., H. Wekerle, and J. Antel, *Genetic models for CNS inflammation*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 161-6.

33. Bischof, F., et al., *Specific treatment of autoimmunity with recombinant invariant chains in which CLIP is replaced by self-epitopes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12168-73.
34. Weissert, R., et al., *MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats*. J Clin Invest, 1998. **102**(6): p. 1265-73.
35. Hofstetter, H.H., C.L. Shive, and T.G. Forsthuber, *Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells*. J Immunol, 2002. **169**(1): p. 117-25.
36. Anderson, A.C., et al., *High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire*. J Exp Med, 2000. **191**(5): p. 761-70.
37. Hof, H., R.L. Müller, and R. Dörries, *Mikrobiologie*. 1 ed. 2000.
38. Kayser, F.H., et al., *Medizinische Mikrobiologie: verstehen, lernen, nachschlagen*. 9 ed. 1998.
39. Tamura, M., et al., *Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model*. Biochemistry, 1982. **21**(22): p. 5516-22.
40. Tamura, M., et al., *A role of the B-oligomer moiety of islet-activating protein, pertussis toxin, in development of the biological effects on intact cells*. J Biol Chem, 1983. **258**(11): p. 6756-61.
41. Shive, C.L., et al., *The enhanced antigen-specific production of cytokines induced by pertussis toxin is due to clonal expansion of T cells and not to altered effector functions of long-term memory cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(8): p. 2422-31.
42. Löffler, G. and P.E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. 6 ed. 1999.
43. Kamradt, T., et al., *Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein*. J Immunol, 1991. **147**(10): p. 3296-302.
44. Su, S.B., et al., *Pertussis toxin inhibits induction of tissue-specific autoimmune disease by disrupting G protein-coupled signals*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 250-6.
45. Amiel, S.A., *The effects of Bordetella pertussis vaccine on cerebral vascular permeability*. Br J Exp Pathol, 1976. **57**(6): p. 653-62.
46. Tonra, J.R., et al., *Comparison of the timing of acute blood-brain barrier breakdown to rabbit immunoglobulin G in the cerebellum and spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Comp Neurol, 2001. **430**(1): p. 131-44.
47. Linthicum, D.S., *Development of acute autoimmune encephalomyelitis in mice: factors regulating the effector phase of the disease*. Immunobiology, 1982. **162**(3): p. 211-20.

48. Yong, T., G.A. Meininger, and D.S. Linthicum, *Enhancement of histamine-induced vascular leakage by pertussis toxin in SJL/J mice but not BALB/c mice*. J Neuroimmunol, 1993. **45**(1-2): p. 47-52.
49. Kong, A.S. and S.I. Morse, *The in vitro effects of Bordetella pertussis lymphocytosis-promoting factor on murine lymphocytes. I. Proliferative response*. J Exp Med, 1977. **145**(1): p. 151-62.
50. Ryan, M., et al., *Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28*. Int Immunol, 1998. **10**(5): p. 651-62.
51. Papayannopoulou, T., et al., *The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4739-47.
52. Cyster, J.G. and C.C. Goodnow, *Pertussis toxin inhibits migration of B and T lymphocytes into splenic white pulp cords*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 581-6.
53. Ramirez, R., et al., *Pertussis toxin inhibits activation-induced cell death of human thymocytes, pre-B leukemia cells and monocytes*. J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 1147-52.
54. Goverman, J., et al., *Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity*. Cell, 1993. **72**(4): p. 551-60.
55. Ben-Nun, A., S. Yossefi, and D. Lehmann, *Protection against autoimmune disease by bacterial agents. II. PPD and pertussis toxin as proteins active in protecting mice against experimental autoimmune encephalomyelitis*. Eur J Immunol, 1993. **23**(3): p. 689-96.
56. Robinson, D., et al., *Native, but not genetically inactivated, pertussis toxin protects mice against experimental allergic encephalomyelitis*. Cell Immunol, 1996. **168**(2): p. 165-73.
57. Ben-Nun, A., I. Mendel, and N. Kerlero de Rosbo, *Immunomodulation of murine experimental autoimmune encephalomyelitis by pertussis toxin: the protective activity, but not the disease-enhancing activity, can be attributed to the nontoxic B-oligomer*. Proc Assoc Am Physicians, 1997. **109**(2): p. 120-5.
58. Alt, C., M. Laschinger, and B. Engelhardt, *Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis*. Eur J Immunol, 2002. **32**(8): p. 2133-44.
59. Arimoto, H., et al., *Analysis of experimental autoimmune encephalomyelitis induced in F344 rats by pertussis toxin administration*. J Neuroimmunol, 2000. **104**(1): p. 15-21.
60. Piccio, L., et al., *Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glyco-*

- protein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors.* J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1940-9.
61. Furlan, R., et al., *Vaccination with amyloid-beta peptide induces autoimmune encephalomyelitis in C57/BL6 mice.* Brain, 2003. **126**(Pt 2): p. 285-91.
 62. Böcker, W., H. Denk, and P.U. Heitz, *Pathologie.* 2 ed. 2001.
 63. Rathmell, J.C. and C.B. Thompson, *The central effectors of cell death in the immune system.* Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 781-828.
 64. Marsden, V.S. and A. Strasser, *Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 71-105.
 65. Green, D.R., N. Droin, and M. Pinkoski, *Activation-induced cell death in T cells.* Immunol Rev, 2003. **193**: p. 70-81.
 66. Webb, S., C. Morris, and J. Sprent, *Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity.* Cell, 1990. **63**(6): p. 1249-56.
 67. O'Brien, I.E., C.P. Reutelingsperger, and K.M. Holdaway, *Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants.* Cytometry, 1997. **29**(1): p. 28-33.
 68. Flugel, A., et al., *Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis.* Immunity, 2001. **14**(5): p. 547-60.
 69. Flugel, A., et al., *Gene transfer into CD4+ T lymphocytes: green fluorescent protein-engineered, encephalitogenic T cells illuminate brain autoimmune responses.* Nat Med, 1999. **5**(7): p. 843-7.
 70. Lafaille, J.J., et al., *Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease.* J Exp Med, 1997. **186**(2): p. 307-12.
 71. Altman, J.D., et al., *Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.* Science, 1996. **274**(5284): p. 94-6.
 72. Gutgemann, I., et al., *Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen.* Immunity, 1998. **8**(6): p. 667-73.
 73. Haanen, J.B., et al., *In situ detection of virus- and tumor-specific T-cell immunity.* Nat Med, 2000. **6**(9): p. 1056-60.
 74. Flynn, K.J., et al., *Virus-specific CD8+ T cells in primary and secondary influenza pneumonia.* Immunity, 1998. **8**(6): p. 683-91.
 75. Flynn, K.J., et al., *In vivo proliferation of naive and memory influenza-specific CD8(+) T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8597-602.
 76. Bischof, F., et al., *Analysis of autoreactive CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis after primary and secondary challenge using MHC class II tetramers.* J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2878-84.

77. Kozono, H., et al., *Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides*. Nature, 1994. **369**(6476): p. 151-4.
78. Becher, B., et al., *The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system*. J Exp Med, 2001. **193**(8): p. 967-74.
79. Amend, B., et al., *Induction of Autoimmunity by Expansion of Autoreactive CD4+CD62Llow Cells In Vivo*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4384-90.
80. Bargatze, R.F. and E.C. Butcher, *Rapid G protein-regulated activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial venules*. J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 367-72.
81. Adamson, P., et al., *Lymphocyte trafficking through the blood-brain barrier is dependent on endothelial cell heterotrimeric G-protein signaling*. Faseb J, 2002. **16**(10): p. 1185-94.
82. Hofstetter, H.H., et al., *Autoreactive T cells promote post-traumatic healing in the central nervous system*. J Neuroimmunol, 2003. **134**(1-2): p. 25-34.
83. Brocke, S., et al., *Antibodies to CD44 and integrin alpha4, but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking secondary leukocyte recruitment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6896-901.
84. Hofstetter, H.H., et al., *Does the frequency and avidity spectrum of the neuroantigen-specific T cells in the blood mirror the autoimmune process in the central nervous system of mice undergoing experimental allergic encephalomyelitis?* J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4598-605.
85. Jalkanen, S., et al., *A distinct endothelial cell recognition system that controls lymphocyte traffic into inflamed synovium*. Science, 1986. **233**(4763): p. 556-8.
86. Laman, J.D., et al., *Therapy with antibodies against CD40L (CD154) and CD44-variant isoforms reduces experimental autoimmune encephalomyelitis induced by a proteolipid protein peptide*. Mult Scler, 1998. **4**(3): p. 147-53.
87. Brennan, F.R., et al., *CD44 is involved in selective leucocyte extravasation during inflammatory central nervous system disease*. Immunology, 1999. **98**(3): p. 427-35.
88. Howard, L.M., et al., *Normal Th1 development following long-term therapeutic blockade of CD154-CD40 in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Clin Invest, 2002. **109**(2): p. 233-41.
89. Issazadeh, S., et al., *Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1104-12.
90. Ranheim, E.A. and T.J. Kipps, *Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 925-35.

91. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 111-35.
92. Yellin, M.J., et al., *Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals*. *J Exp Med*, 1995. **182**(6): p. 1857-64.
93. Dittel, B.N., R.M. Merchant, and C.A. Janeway, Jr., *Evidence for Fas-dependent and Fas-independent mechanisms in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol*, 1999. **162**(11): p. 6392-400.
94. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 789-95.
95. Bonetti, B., et al., *Cell death during autoimmune demyelination: effector but not target cells are eliminated by apoptosis*. *J Immunol*, 1997. **159**(11): p. 5733-41.
96. Ouallet, J., et al., *Fas system up-regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neurol Sci*, 1999. **170**(2): p. 96-104.
97. Rathmell, J.C., et al., *Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor*. *Cell*, 1996. **87**(2): p. 319-29.
98. Suvannavejh, G.C., et al., *Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(2): p. 223-31.
99. Pender, M.P. and M.J. Rist, *Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia*. *Glia*, 2001. **36**(2): p. 137-44.
100. Sabelko-Downes, K.A., A.H. Cross, and J.H. Russell, *Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis*. *J Exp Med*, 1999. **189**(8): p. 1195-205.
101. MacKenzie-Graham, A.J., et al., *Myelin protein expression is increased in lymph nodes of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol*, 1997. **159**(9): p. 4602-10.
102. Hou, W., et al., *Pertussis toxin enhances Th1 responses by stimulation of dendritic cells*. *J Immunol*, 2003. **170**(4): p. 1728-36.
103. Zhu, B., et al., *Intrathecal Fas ligand infusion strengthens immunoprivilege of central nervous system and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol*, 2002. **169**(3): p. 1561-9.

VI Danksagung

Ich möchte hier an erster Stelle meinen Eltern danken, die mich immer durch Motivation und Beistand, aber auch finanziell unterstützt haben.

Ich danke meiner Frau Katja für die kontinuierliche geleistete Inspiration und Unterstützung (auch wenn die gemeinsame Zeit oft viel zu kurz war).

Dank an meine Großeltern, die mich in gemeinsamen Zeiten stets gefördert haben und mir als Leitbild dienten.

Für die Überlassung des Themas und die fruchtbaren wissenschaftlichen Gespräche danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. A. Melms.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. Felix Bischof, bin ich für die fachliche und inhaltliche Betreuung, ebenso wie für sein Engagement, welches zur Veröffentlichung der Arbeit führte, dankbar.

Ausdrücklich sei Frau Evelyn Dubois aus dem Team des Neurologielabors für ihre erstklassige Betreuung und Anleitung während meiner gesamten praktischen Tätigkeit im Labor genannt. Ohne unsere Gespräche wäre sicherlich so manche Hürde eines jungen Forschers nicht so einfach überwunden worden.

Meinem Freund Peter Menke danke ich für unzählige Gespräche und Motivation auch über die Promotion hinaus. Meinem Kommilitonen und Mitdoktoranten Christian Lange danke ich neben der Kooperation für die gemeinsam verbrachte Zeit, aus der sich eine Freundschaft entwickelte.

Zum Abschluss möchte ich denjenigen danken, die nicht speziell genannt wurden, denn die Bearbeitung einer Fragestellung bis zur Fertigstellung einer Dissertation benötigt viele Menschen und Freunde. Dafür möchte ich allen von Herzen danken.

Leinfelden-Echterdingen, 26.06.2008

Bastian Amend

VII Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Amend
Vorname: Bastian
Geburtstag: 06.01.1979
Geburtsort: Marbach am Neckar
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet
Eltern: Bernhard Amend, geb. 11.10.1948, Ministerialrat
Christel Amend, geb. 05.02.1950, Hausfrau

Berufliche Tätigkeit

Seit 12/2005 Assistenzarzt an der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums
Tübingen

Schulische Ausbildung

1985-1989 Grundschule Erdmannhausen
1989-1998 Friedrich-Schiller-Gymnasium Marbach am Neckar (Abschluss: Allgemeine Hochschulreife)

Akademische Ausbildung

1999-2005 Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen
22.11.2005 Ärztliche Prüfung (3. Staatsexamen)

Wehrdienst

1998-1999 Grundausbildung und Tätigkeit als Soldat im Stabsdienst im Dezernat
Heeresflieger des Stabes des II. (GE/US) Korps in Ulm

Hobbys

Kirchenorgel, Tischtennis, Fußball, Flugsimulation

Leinfelden-Echterdingen, den 26.06.2008