

Aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

**Proteinexpression und Verteilung von lymphozytären
Zellen im menschlichen Rückenmark**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ariane Michaela Chaudhuri, geb. Schleich

aus
München

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wolburg

Abkürzungen

ALS	<u>A</u> myotrophe <u>L</u> ateral <u>S</u> klerose
APC	<u>a</u> ntigen <u>p</u> resenting <u>c</u> ells
β-APP	<u>β</u> eta- <u>a</u> myloid- <u>p</u> recursor- <u>p</u> rotein
BBB	<u>b</u> lood <u>b</u> rain <u>b</u> arrier
BDNF	<u>b</u> rain <u>d</u> erived <u>n</u> eurotrophic <u>f</u> actor
bFGF	<u>b</u> asic <u>f</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
bzw.	<u>b</u> e <u>z</u> ie <u>h</u> un <u>g</u> s <u>w</u> e <u>i</u> s <u>e</u>
C	<u>c</u> ervical
CCL	<u>c</u> hemokine <u>l</u> igand
CD	<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferenci <u>a</u> tion
CSF	<u>c</u> erebrospinal <u>f</u> luid
CTL	<u>c</u> ytotoxic <u>T</u> -lymphocyte
CUP	<u>c</u> ancer of <u>u</u> nknown <u>p</u> rim <u>a</u> ry
(E)	<u>E</u> ntzündung
EAE	<u>e</u> xperimental <u>a</u> utoimmune <u>e</u> ncephalomyelitis
FN CS-1	<u>f</u> ibron <u>e</u> ctin <u>c</u> onnecting <u>s</u> egment <u>1</u>
frgl.	<u>f</u> rag <u>l</u> ich
GBS	<u>G</u> uillain <u>B</u> arré <u>S</u> yndrom
GDNF	<u>g</u> lial cell line- <u>d</u> erived <u>n</u> eurotrophic <u>f</u> actor
GFAP	<u>g</u> lial <u>f</u> ibrillary <u>a</u> cide <u>p</u> rotein
HH	<u>H</u> inter <u>h</u> orn
HLA	<u>h</u> umanes <u>L</u> eukozyten <u>A</u> ntigen
HS	<u>H</u> intersäule
ICAM	<u>I</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule
ICOS	<u>i</u> nducible <u>c</u> ostimulatory <u>s</u> ignal
Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IL	<u>I</u> nterleukin
ITAM	<u>i</u> mmunoreceptor <u>t</u> yrosine-based <u>a</u> ctivation <u>m</u> otifs
JAM	<u>j</u> unction <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule
K ⁺	<u>K</u> alium-Ion
Ki67	Ki-67 nuclear antigen

kDa	<u>K</u> ilodalton
L	<u>L</u> umbal
LCA	<u>l</u> eukocyte <u>c</u> ommon <u>a</u> ntigen
LCF	<u>l</u> ymphocyte <u>c</u> hemoattractant <u>f</u> actor
Lck	<u>l</u> ymphocyte-specific protein tyrosine <u>k</u> inase
LFA-1	<u>l</u> ymphocyte <u>f</u> unction-associated <u>a</u> ntigen-1
(M)	<u>M</u> alignom
m	<u>m</u> ännlich
MHC	<u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex
Min.	<u>M</u> inute
MMP	<u>m</u> atrix <u>m</u> etalloproteinase
MS	<u>M</u> ultiple <u>S</u> klerose
NK	<u>n</u> atürliche <u>K</u> illerzellen
NO	<u>N</u> itrogeniumoxid = Stickstoffmonoxid
pH	<u>p</u> otentia <u>h</u> ydrogenii
S	<u>s</u> akral
SS	<u>S</u> eiten <u>s</u> äule
T _{EM}	<u>e</u> ffector <u>m</u> emory <u>T</u> -cell
T _{CM}	<u>c</u> entral <u>m</u> emory <u>T</u> -cell
TBS	<u>t</u> ert- <u>b</u> utyl-di-methyl- <u>s</u> ilyl
TCR	<u>T</u> -cell <u>r</u> eceptor
TGF	<u>t</u> umour <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
Th	<u>t</u> horacal
TNF	<u>T</u> umor <u>N</u> ekrose <u>F</u> aktor
Treg	<u>r</u> egulatorische <u>T</u> -Zellen
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
VH	<u>V</u> order <u>h</u> orn
VS	<u>V</u> ordersäule
w	<u>w</u> eiblich
ZNS	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervens <u>s</u> ystem
Zk	<u>Z</u> entralkanal

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	iv
Inhaltsverzeichnis	vi
1. Einleitung: Immunabwehr im ZNS	8
1.1. Historischer Rückblick	8
1.2. Immunprivileg	10
1.3. Komponenten der Immunabwehr im ZNS	15
1.3.1. Zelluläre Komponenten	15
1.3.2. Nicht-zelluläre Komponenten der Immunabwehr im ZNS	18
1.4. Lymphozyten als Teil der Immunabwehr im ZNS	21
1.4.1. Herkunft, Subtypen und Aufgaben im peripheren Immunsystem	21
1.4.2. Wege der Lymphozyten ins ZNS	29
1.4.3. Aufenthalt der Lymphozyten im ZNS	37
1.4.4. Bisherige Daten über Lymphozyten im ZNS	38
1.5. Ziele und Fragestellung dieser Arbeit	40
2. Material und Methoden	42
2.1. Patientendaten	42
2.1.1. Allgemeines	42
2.1.2. Klinische Daten	43
2.2. Gewebeproben	46
2.3. Herstellung der histologischen Präparate	47
2.4. Immunhistochemie	48
2.4.1. Antikörper zur Darstellung von Lymphozyten	48
2.4.2. Antikörper zur Darstellung von Mikroglia	52
2.4.3. Vorbehandlung und immunhistochemische Färbung	52
2.4.4. Doppelfärbungen zur Überprüfung der Selektivität	54
2.5. Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung	54
2.6. Statistische Methoden	55

3.	Ergebnisse	56
3.1.	Vorwort.....	56
3.2.	Grundlegende Ergebnisse	58
3.3.	Antikörpersubtypen	59
3.4.	Lage der Lymphozyten.....	65
3.4.1.	Lage der Lymphozyten in Relation zu den Gefäßen	65
3.4.2.	Verteilung der Lymphozyten grauer und weißer Substanz	66
3.4.3.	Regionale Verteilung der Lymphozytenpopulationen.....	69
3.4.4.	Lage der Lymphozyten in Bezug auf die Rückenmarkshöhe	70
3.5.	Vergleich der verschiedenen Patientengruppen	71
3.5.1.	Lymphozytenverteilung in Abhängigkeit vom Lebensalter und Geschlecht	71
3.5.2.	Einfluss einer Entzündungskonstellation.....	73
3.5.4.	Einfluss einer malignen Erkrankung.....	74
3.5.5.	Einzelfälle mit Auffälligkeiten in Verteilung oder Anzahl der Lymphozyten.....	75
3.6.	Ergebnisse der Doppelfärbungen	76
3.7.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	78
4.	Diskussion.....	80
4.1.	Anwesenheit von Lymphozyten im Rückenmark auch im Gesunden. 80	
4.2.	Weiterführende Fragen	92
4.3.	Lymphozyten als Induktoren des Immunprivilegs?.....	93
4.4.	Lymphozyten als Neuroprotektoren?	95
4.5.	Diskussion der aufgefallenen Einzelfälle.....	96
4.6.	Schlussfolgerungen.....	98
	Zusammenfassung.....	100
	Bibliographie.....	102
	Anhang	121
	Diagramme pro Patient.....	121
	Danksagung.....	124
	Lebenslauf Ariane Chaudhuri	125

1. Einleitung: Immunabwehr im Zentralen Nervensystem

Bei vielen Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS), z.B. der Multiplen Sklerose (MS), spielt die immunologische Reaktion eine entscheidende Rolle am schmalen Grad zwischen Schutz und Pathogenität. Die immunologischen Zusammenhänge und Reaktionen im ZNS sind sehr komplex und variieren abhängig von der Erkrankung deutlich in ihrem Ausmaß und in ihrem Ablauf (Dietzschold und Richt, 2002).

Im Bereich der Neuroimmunologie besteht nach wie vor ein großer Forschungsbedarf, um ein tief greifendes Verständnis der verschiedenen Erkrankungen und damit Möglichkeiten für therapeutische Ansätze zu schaffen. Die Induktion, der Ablauf und das Ergebnis von Immunantworten im ZNS ist erst teilweise verstanden (Dietzschold und Richt, 2002).

1.1. Historischer Rückblick

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Existenz einer funktionellen Schranke zwischen Gehirn und peripherer Blutzirkulation vermutet (Ehrlich, 1885; Goldmann, 1909).

Fast 80 Jahre lang war das Gehirn als „immunologisch isoliertes Organ“ gesehen worden, basierend auf den Beobachtungen von Shirai, dass Rattensarkomgewebe nach Einpflanzung im zerebralen Parenchym gut gedieh, im Gegensatz zu dem in peripherem Gewebe lokalisierten Sarkomgewebe (Shirai, 1921). Zwei Jahre später konnten Murphy und Sturm zeigen, dass die beobachtete Immuntoleranz auf einer Trennung vom systemischen Immunsystem beruht, als ko-transplantierte Milz das Wachstums des Sarkoms bremste (Murphy und Sturm, 1923). Das waren die ersten Hinweise auf jene Besonderheit, die später „Immunprivileg“ genannt wurde (Billingham und Boswell, 1953; Scheinberg et al., 1966). Über die Jahre bestätigten sich diese Beobachtungen auch für andere Entitäten wie Gewebstransplantate (Medawar, 1948), Bakterien (Matyszak und Perry, 1995), Viren (Stevenson et al., 1997) und Vektoren (Byrnes et al., 1996). Durch die Prä-Immunisierung von Tieren durch Haut-zu-Haut-Transplantate vor der Einpflanzung von Haut ins Hirnparenchym konnte Medawar zeigen, dass der efferente Arm der Immunabwehr relativ intakt war (Medawar, 1948).

Einleitung

Lange Zeit war das Immunprivileg hauptsächlich durch die Anwesenheit der Blut-Hirn-Schranke erklärt worden, während später die Erkenntnis wuchs, dass die Blut-Hirn-Schranke nur einen Teil des Immunprivilegs ausmacht (Galea et al., 2007).

Aufgrund der offensichtlichen Diskonnektion war man damals von einer strikten anatomischen und physiologischen Trennung des Immunsystems und des ZNS ausgegangen. Man glaubte, dass Interaktionen zwischen den beiden Systemen nur in pathologischen Situationen auftreten (Bradl und Flügel, 2002).

Das somit entstandene Paradigma des Immunprivilegs wurde durch die Abwesenheit von Lymphozyten im gesunden menschlichen ZNS-Gewebe (Barker und Billingham, 1977) sowie anderen anatomischen und histologischen Besonderheiten, wie beispielsweise der reduzierten Anzahl an Lymphgefäßen und der fehlenden Migration von Antigenpräsentierenden Zellen aus dem ZNS zu den zervikalen Lymphknoten entlang der existierenden perivaskulären Lymphdrainagewege erklärt (Weller et al., 2009).

Die Entdeckung der Mikrogliazellen 1927 durch del Rio Hortega als distinkte Gliazelle neben Astrozyten und Oligodendrozyten führte ab den siebziger Jahren zu der Erkenntnis, dass die Aufgabe der Mikrogliazellen in der Immunabwehr liegt und einen spezifischen Abwehrmechanismus im ZNS darstellt, der mit dem Monozyten-Makrophagen-System vergleichbar ist (Kim und de Vellis, 2005) und wahrscheinlich auch monozytären Ursprungs ist (Geissmann et al., 2008).

Unter anderem die Ergebnisse von Wekerle (1987), die den Übertritt von Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke in zentralnervöses Gewebe direkt zeigen konnten (Wekerle et al., 1987) leiteten einen Paradigmenwechsel ein, der zu einem Umdenken und einer Neudefinition des Begriffs des Immunprivilegs im vergangenen Jahrzehnt führte. So ist die Immunüberwachung des gesunden menschlichen ZNS durch aktivierte Lymphozyten seit den Erkenntnissen von Wekerle 1987 und von Hickey 1991 als ein wesentlicher Teil der Immunabwehr im ZNS unumstritten (Hickey et al., 1991; Cserr und Knopf, 1992).

In der heutigen Zeit ist anerkannt, dass eine bilaterale Kommunikation zwischen dem Immunsystem und dem ZNS stattfindet, in Gesundheit und Krankheit (Bradl and Flügel, 2002). Das ZNS (inklusive Rückenmark) zeichnet sich somit als Organ mit einer verminderten immunologischen Reaktion sowie einer reduzierten, aber vorhandenen Kontrolle durch lymphozytäre Zellen aus.

Einleitung

Ein Immunprivileg im Sinne eines *relativen* Privilegs im Vergleich zu anderen Organen (Galea et al., 2007; Kleine und Benes, 2006) besteht somit zweifelsohne, von einer strikten Trennung kann aber nicht mehr gesprochen werden. Das ZNS spielt eine aktive Rolle in seiner immunologischen Verteidigung (Dietzschold und Richt, 2002; Galea et al., 2007). In den letzten Jahren wurde sogar vorgeschlagen, besser von einem immunologisch spezialisierten Raum zu sprechen als von einem immunprivilegierten, da Immunzellen und normale Immunmechanismen genauso wie im restlichen Körper vorhanden sind, wenn auch in deutlich geringerer Menge (Ransohoff et al., 2003).

1.2. Immunprivileg

Einige Bereiche des Körpers, unter anderem das ZNS, gelten als immunprivilegierte Regionen. Diese sind in der Regel durch Gewebsbarrieren vom Rest des Körpers abgetrennt und haben zum Teil spezielle Immunabwehrmechanismen und andere Besonderheiten entwickelt. Die Immunreaktion in den immunprivilegierten Bereichen ist in der Regel weniger stark ausgeprägt als in den übrigen Organen. Die Charakteristika eines Immunprivilegs sowie Hypothesen zu seiner Entstehung sollen im Folgenden besprochen werden.

Obwohl die Regulation der Immunprozesse im ZNS nicht identisch mit den beobachteten Immunregulationsmechanismen in anderen Körperregionen (mit kontinuierlicher Antigenstimulation) sein kann, so darf man nicht den voreiligen Schluss ziehen, dass das Gehirn nicht das Potential für eine suffiziente Immunreaktivität besitzt, z.B. wenn die Blut-Hirn-Schranke zusammenbricht oder aktivierte Lymphozyten durch die intakte Blut-Hirn-Schranke ins ZNS eindringen (Harling-Berg et al., 2002).

Außer dem ZNS weisen noch andere Orte im menschlichen Körper, wie das Auge (vordere Kammer), der schwangere Uterus, der Hoden, das Ovar, die Haarfollikel, die Nebennierenrinde und auch Tumore, diese immunologische Besonderheit auf (Streilein, 1995).

Einleitung

In den letzten Jahren wurde diesbezüglich postuliert, dass ein Immunprivileg in Antwort auf eine Entzündung auch in anderen Geweben/Organen neu entstehen kann. Die Induktion von Immunprivileg wird dabei als therapeutische Maßnahme des Immunsystems gewertet, die vor allem durch die Aktivität von regulatorischen T-Zellen beeinflusst zu sein scheint (Cobbold et al., 2006).

Sobald sich jedoch eine Entzündungsreaktion im ZNS etabliert hat, kommt es zu einem Zusammenbruch des Immunprivilegs. Mehrfache Gründe können für diese Veränderung genannt werden: der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, lokale immunstimulatorische Effekte von Zytokinen und Chemokinen, die Vereinfachung der Antigen-Drainage in die Peripherie, das Auftreten von dendritischen Zellen und die Bildung von tertiären lymphoidem Gewebe in den Meningen (Galea et al., 2007).

Hypothesen zur Entwicklung eines Immunprivilegs am Beispiel des ZNS

Im ZNS stellt sich eine besondere immunologische Situation dar, da das ZNS als zentrales lebenswichtiges Steuerungsorgan in besonderer Weise schützenswert ist (Aloisi, 2001). Die Schutzmechanismen müssen einerseits sehr sensitiv und andererseits sehr spezifisch sein, da jeder Schaden zu großen Verlusten führen kann (Mrass und Weninger, 2006).

Jede Entzündungsreaktion im Gehirn kann zur Zerstörung von wertvollen und nicht regenerationsfähigen Nervenzellen (Asensio und Campell, 1999) führen – „unnötige“ oder „übertriebene“ Entzündungsreaktionen müssen soweit möglich vermieden werden. ZNS-ständige Zellen können beispielsweise mittels Apoptoseinduktion auf das Vorhandensein von Virus-infizierte Nervenzellen reagieren – je nach Ausmaß des so ausgelösten Zelltods kann das Ergebnis protektiv oder schädigend/pathogen sein (Dietzschold und Richt, 2002). In diesem Zusammenhang lässt sich auch die „Toleranz“ und Persistenz von neurotrophen Viren im ZNS erklären (Beispiel: Herpes zoster in Ganglienzellen), wobei die Toleranz der Viren weniger negative Auswirkungen hat als eine Abwehrreaktion mit schweren neurologischen Auswirkungen (Kwidzinski et al., 2003, Bechmann et al., 2005).

Auch Begleitschäden, zum Beispiel ein Ödem, können gravierende Auswirkungen auf die Umgebung der Entzündung haben. Gerade für das in der Schädelkalotte räumlich sehr begrenzte Gehirn stellt die Hirnschwellung eine große Gefahr dar.

Einleitung

Eine gewisse Immuntoleranz kann „unnötige“ Entzündungsreaktionen verhindern und dadurch wichtige Zellen vor Lyse und Tod schützen. Das Immunprivileg somit ist unverzichtbar im Rahmen einer Schadenslimitierung während Inflammation in einem sensiblen Organ mit geringen regenerativen Fähigkeiten (Galea et al., 2007).

Typische Charakteristika von immunprivilegierten Organen am Beispiel des ZNS

Gewebsschranken (ZNS: Blut-Hirn-Schranke)

Verschiedene Aspekte scheinen eine Rolle für die Entwicklung eines Immunprivilegs zu spielen. Dazu gehören Gewebebarrieren, wie beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke, die das ZNS durch eine dichte endotheliale Barriere vom restlichen Körper abgrenzt und dadurch den unkontrollierten Einfluss von Proteinen und Zellen ins ZNS verhindert (Barker und Billingham, 1977). Beispielsweise können nur aktivierte Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke durchqueren, aber auch die angeborene Immunantwort unterliegt dem Immunprivileg im ZNS-Parenchym (Galea et al., 2007). Die Blut-Hirn-Schranke reduziert dadurch das Ausmaß an Antigenstimulation aus dem Blut. Folglich reagiert das Gehirn mit einer (auf diesen verhältnismäßig niedrigen Level an Antigenstimulation) angepassten Immunreaktion (Harling-Berg et al., 2002). Das Immunprivileg ist rein auf das Gehirnparenchym beschränkt (Galea et al., 2007).

Abwesenheit von Lymphgefäßen

Ein weiteres Charakteristikum von immunprivilegierten Organen ist das Fehlen von klassischen Lymphgefäßen (Barker und Billingham, 1977), die für den Transport von fremdem Antigen zu den Immunorganen von großer Bedeutung sind (in direkter Weise oder indirekt über Antigenpräsentierende Zellen) (Ransohoff et al., 2003).

Die Unfähigkeit der Antigenpräsentierenden Zellen entlang der perivaskulären Lymphdrainagewege das ZNS zu verlassen mag einen entscheidenden Faktor zur Bildung und Aufrechterhaltung des Immunprivilegs des ZNS darstellen. Im ZNS erfolgt der Abfluss der zerebrospinalen Flüssigkeit hauptsächlich durch die kribriiforme Platte in die nasalen Lymphgefäße. Der Lymphabfluss von interstitieller Flüssigkeit und zerebrospinaler Flüssigkeit sowie die spezialisierten zervikalen Lymphknoten spielen wichtige Rollen in der Induktion von Immuntoleranz und erworbener Immunantwort im ZNS (Weller et al., 2009).

Einleitung

Im ZNS findet somit trotz Abwesenheit von konventionellen Lymphgefäßen ein Lymphabfluss statt, der jedoch durch die besonderen Begebenheiten nur aus flüssigen Anteilen besteht und damit nur einen Teil des afferenten Arms der Immunabwehr bedient (Galea et al., 2007). Der afferente Arm des Immunsystems unterliegt somit anderen anatomischen Gegebenheiten als im übrigen Körper.

Trotz dieser Besonderheit konnte gezeigt werden, dass zervikale Lymphknoten sowohl in der B-Zell als auch in der T-Zell vermittelten Immunantwort des Gehirns eine Rolle spielen.

Abwesenheit von professionellen Antigenpräsentierenden Zellen

Des Weiteren sind in den immunprivilegierten Geweben nur wenige bis keine professionellen Antigenpräsentierende Zellen (APC) zu finden (Gell und Coombs, 1968; Wekerle, 1994). Im ZNS haben die Mikrogliazellen die Aufgabe der Antigenpräsentation teilweise übernommen – professionelle antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen, scheinen aber in im naiven und gesunden Gehirn nicht vorhanden zu sein (Aloisi, 2001).

Mangel an MHC-Expression

Auch durch einen Mangel an MHC-Expression im ZNS (Hayes et al., 1987; Vass und Lassmann, 1990) wird die spezifische Immunantwort unterdrückt, da T-Lymphozyten diese Kostimulation zu ihrer Aktivierung benötigen (Wekerle, 2002). Die reduzierte MHC-Expression konzentriert sich auf die Mikrogliazellen (hauptsächlich im lumbalen Rückenmark und in der weißen Substanz des Großhirns) (Vass und Lassmann, 1990) und geht eng mit der Abwesenheit von professionellen Antigenpräsentierenden Zellen einher. Allerdings können Astrozyten in einigen Fällen gegenüber T-Zellen als Antigenpräsentierende Zellen agieren (MHC-abhängig) und scheinen eine zentrale Rolle in der Ausbildung der Immunantwort im ZNS zu spielen (Fontana et al., 1984).

Umgebungsfaktoren

Weiterhin scheinen einige Zytokine eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit dem Immunprivileg zu spielen. Hier ist vor allem TGF- β zu nennen, der die Migration von Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke und die Proliferation von T-Lymphozyten unterdrücken kann (Hickey, 2001) und weiterhin bei Antigenkontakt vor allem T-Zell-Antworten ohne Gewebeschäden auslöst. Auch die Expression des FAS-Liganden trägt zum Immunprivileg bei, indem FAS tragende Lymphozyten abgetötet werden (Green et al., 2003; Bechmann et al., 1999) dadurch zusätzlich die Anzahl von Lymphozyten im Hirnparenchym vermindert wird.

Die Bluthirnschranke kreiert ein sorgfältig reguliertes intrakranielles Umfeld, das reich an nativen immunregulatorischen Molekülen wie beispielsweise Neuropeptiden (Substanz P, vasoaktive Peptide), neuronalen Wachstumsfaktoren und Interleukinen (IL1, IL6) ist (Harling-Berg et al., 2002).

Zusammenfassung

Mittlerweile weiß man, dass immunprivilegierte Organe keinesfalls vom Immunsystem ausgeschlossen sind, sondern dass durch das ZNS ständig T-Zellen patrouillieren (Wekerle et al., 1987, Hickey et al., 1991, Hickey, 2001) und dass ein Lymphabfluss stattfindet (Cserr et al., 1992; Weller et al., 1992; Kida et al., 1995).

Der efferente Arm der Immunabwehr ist somit vorhanden, wenn auch reduziert. Der afferente Arm ist in seiner zellulären Route nicht vorhanden, wohingegen die Route der löslichen Substanzen normal funktioniert (Galea et al., 2007).

Das ZNS hat somit wie die restlichen Organe am Immunsystem teil, nur in einer modifizierte Art und Weise. Somit kann man „Immunprivileg“ als eine reduzierte Aktivierbarkeit des spezifischen und unspezifischen Immunsystems definieren (Wekerle, 2002). Während einer Entzündung kann ein starker Anstieg der Lymphozytenzahl verzeichnet werden (Qing et al., 2000).

Dennoch kommt es auch im ZNS zur immunologischen Abwehr von Antigenen und auch zu Immunerkrankungen. Beispielsweise im Falle der Multiplen Sklerose kommt es zu einer immunologisch induzierten Zerstörung der Myelinscheiden der Nerven (Rosche et al., 2003).

Die Komplexität des Immunsystems deutet bereits darauf hin, welche wichtige Rolle der Funktionsfähigkeit der Abwehr und einer adäquaten Immunantwort zukommen muss. Es gilt, den Körper ausreichend zu schützen, ohne unnötig viel zu zerstören. Dieses empfindliche Gleichgewicht beinhaltet eine große Störanfälligkeit und die Gefahr, dass das Immunsystem über- oder unterreagiert oder sich gegen das Selbst richtet. Es kann zur Immunschwäche, zu schweren Begleitschäden oder auch zu Autoimmunreaktionen kommen (Jiang und Chess, 2004).

1.3. **Komponenten der Immunabwehr im ZNS**

Die Induktion einer Immunantwort kann in der Peripherie mit dem Verlassen des Antigens des ZNS beginnen (afferenter Arm) (Harling-Berg et al., 1999) oder durch das Aussenden von Immunzellen zustande kommen, die im Folgenden auf der Suche nach Antigenen durch das ZNS-Parenchym patrouillieren (efferenter Arm). Sowohl der afferente Arm (Alarmierung des peripheren Immunsystems durch ausgesendete Signale von der Peripherie ausgehend) als auch der efferente Arm (vom peripheren Immunsystem ausgesandte Immunzellen, z.B. Lymphozyten) der Immunabwehr (Dietzschold und Richt, 2002) unterliegen im ZNS besonderen Bedingungen (Immunprivileg).

Im Folgenden sollen die einzelnen Komponenten und Bedingungen der Immunabwehr im ZNS detailliert besprochen werden. Wie bereits dargelegt, gehört das menschliche ZNS zu den immunprivilegierten Organen, weshalb sowohl Grundzüge des peripheren Immunsystems eine Rolle spielen als auch ZNS-spezifische Begebenheiten.

1.3.1. **Zelluläre Komponenten der Immunabwehr im ZNS**

Die an der Immunabwehr des ZNS beteiligten Zellen umfassen Mikrogliazellen, Endothelzellen, Perizyten (Fabry et al., 1994), perivaskuläre Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten. Dendritische Zellen konnten im gesunden ZNS-Parenchym nicht detektiert werden (Perry, 1998).

Einleitung

Mikroglia

Als immunologische Haupteffektorzelle fungiert im ZNS die Mikrogliazelle, die dem Makrophagen/Monozyten-System zugerechnet wird (Graeber und Streit, 1990).

Mikroglia – nach ihrem Entdecker auch Hortega-Zellen genannt – sind in ihrer ramifizierten Form kleine mobile Zellen mit einem länglichen chromatinreichen Kern und schmalem Zytoplasmasaum, von dem Büschel feiner verzweigter Fortsätze abgehen. Zu ihren Aufgaben gehören neben der Phagozytose und der Antigenpräsentation auch immunregulatorische Funktionen (Aloisi, 2001). Beispielsweise wurde beschrieben, dass Mikrogliazellen CD4-positive T-Zellen zur Ausschüttung von Interferon und Tumornekrosefaktor anregen können, wonach die T-Zelle durch Apoptose zu Grunde geht (Ford et al., 1996). Mikrogliazellen exprimieren MHC II, wenn auch in geringer Konzentration in normalem Tier-ZNS (Vass und Lassmann, 1990). Unter physiologischen Bedingungen wird die residente Mikrogliapopulation durch monozytäre Zellen aus der Blutstrombahn ergänzt (Lawson et al., 1992; Priller et al., 2001). Mikrogliazellen sind die einzigen Zellen im ZNS, die MHC II auf einer regulären und grundlegenden Basis ausbilden und angemessen hoch regulieren können (Ford et al., 1996).

Mikrogliazellen lassen sich in eine perivaskuläre und eine parenchymale Population aufteilen, die sich anhand ihres Expressionsmusters und ihrer Funktionen unterscheiden. Perivaskulär findet sich eine Population CD4-positiver Mikroglia, die sich von den ruhenden ramifizierten Mikrogliazellen durch die Expression des Antikörpers CD4 und ein hohes Level an LCA-Expression unterscheidet (Mittelbronn et al., 2001).

Lymphozyten

Lymphozyten spielen im System der peripheren Immunabwehr eine wichtige Rolle. Im ZNS dagegen sind Lymphozyten bei Gesundheit nur gering vertreten, ihre genauen Aufgaben im ZNS-Gewebe sind noch nicht erschöpfend geklärt. Bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen können sie in großer Anzahl nachgewiesen werden und scheinen eine wegweisende Rolle inne zu haben, sowohl in Pathogenese als auch in Rehabilitation (z.B. Remyelination nach Demyelination) (Bieber et al., 2003).

Die Hauptaufgaben der Lymphozyten liegen in der erworbenen Immunabwehr, sie sind die Haupteffektorzellen der spezifischen zellulären Abwehr (T-Zellen, NK-Zellen) und der humoralen Antikörper-vermittelten Immunantwort (B-Zellen) (Fleisher und Oliveira, 2004).

Lymphozyten bilden mit Granulozyten und Monozyten die Gruppe der weißen Blutkörperchen (Leukozyten).

In Kapitel 1.4. wird detailliert auf Subtypen, Hintergründe und Aufgaben der Lymphozyten eingegangen.

Dendritische Zellen

Unter der Annahme, dass die Zirkulation der Hirnflüssigkeiten ein Mechanismus zur Verteilung von Antigenen im Gehirn ist, stellt sich die Frage, ob es im Hirnparenchym naive Zellen gibt, die Antigen prozessieren können und ins Blut oder in die zervikalen Lymphknoten migrieren können, um dort eine Immunantwort zu initiieren. Im extrazerebralen Gewebe übernehmen dendritische Zellen (mit starker Expression von MHC II) diese Aufgabe und aktivieren ruhende T-Zellen und initiieren somit eine Primärantwort auf Antigen (Harling-Berg et al., 2002).

Während dendritische Zellen im gesunden ZNS-Parenchym abwesend zu sein scheinen (Perry, 1998), konnten sie jedoch in der zerebrospinalen Flüssigkeit, sowie Meningen und im choroidalen Plexus nachgewiesen werden (McMenamin et al., 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen an Stellen akkumulieren, wo Antigen intrazerebral injiziert wurde (Karman et al., 2004).

Direkt ins ZNS-Gewebe injizierte dendritische Zellen bewegen sich nur sehr wenig und gelangen nicht in die zervikalen Lymphknoten, wohingegen die in die zerebrospinale Flüssigkeit (cerebrospinal fluid = CSF) injizierten dendritischen Zellen in den zervikalen Lymphknoten erscheinen und dort bevorzugt B-Follikel anvisieren, aber vermehrt eine T-Zell-Antwort auslösen (Hatterer et al., 2006).

Die Bedeutung der dendritischen Zellen wird nach wie vor kontrovers diskutiert: einerseits gibt es viele Hinweise auf eine Funktion der dendritischen Zellen als Initiatoren von Immunantworten im ZNS, andererseits konnten isolierte dendritische Zellen aus dem Gehirn von Mäusen mit EAE keine T-Zell-Antwort auslösen und wurden deshalb als limitierend interpretiert (Hatterer et al., 2006).

Andere Antigenpräsentierende Zellen

Astrozyten und Endothelzellen können jedoch - beispielsweise nach Stimulation mit Interferon γ - ebenfalls als APC agieren (Fabry et al., 1994; Dong und Benveniste, 2001). Perizyten können ebenfalls phagozytieren und Antigen präsentieren (Thomas, 1999). Auch perivaskuläre Zellen – im Virchow-Robin-Raum zwischen der Basalmembran um Perizyten herum und der Basalmembran an der Oberfläche Glia limitans der Hirngefäße gelegen – sind ein Teil der Makrophagenreihe (Bechmann et al., 2001).

Abgesehen von Mikrozellen konnte jedoch für keine der antigenprozessierenden Zellen im ZNS nachgewiesen werden, dass diese Zellen das ZNS verlassen können, möglicherweise spielen sie aber im efferenten Arm der Immunabwehr eine Rolle (Harling-Berg et al., 2002, Hochmeister et al., 2008).

1.3.2. Nicht-zelluläre Komponenten der Immunabwehr im ZNS**Antikörper**

Antikörper sind ein wichtiger Teil der humoralen Immunantwort. Als von Plasmazellen gebildete Immunglobuline werden die Antikörper in Flüssigkeiten sezerniert. Sie dienen der Opsonierung und Neutralisierung von Antigenen. Aufgrund ihrer Größe und Eigenschaften als Protein können in der Regel Antikörper die Blut-Hirn-Schranke in gesundem Zustand nicht überqueren (Bouras et al., 2005, Janeway et al., 2005, S.391). Mittels spezifischer Transporter können einige Proteine die Blut-Hirn-Schranke überqueren (Pardridge, 2007). Innerhalb des gesunden ZNS-Parenchyms spielen Antikörper deshalb keine entscheidende Rolle, wohingegen sie in Blut und Schleimhäuten häufig und auch im Liquor cerebrospinalis von gesunden Patienten (allerdings in sehr geringer Anzahl) vorkommen.

Immunmechanismen, die die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöhen, spielen deshalb eine wichtige Rolle, um Antikörpern Zugang zum ZNS Gewebe zu gewähren (Dietzschold und Richt, 2002).

Botenstoffe und Umgebungsfaktoren

Ein Schlüsselement der meisten Abwehrreaktionen im ZNS ist die Produktion von Chemokinen, Zytokinen, Neuropeptiden und anderen Faktoren durch ZNS-Zellen.

Zum einen wirken diese Stoffe direkt auf das infektiöse Agens (z.B. durch Behinderung der Ausbreitung und Vermehrung, u.a. Typ 1 Interferone), zum anderen können sie als Botenstoffe das adaptive Immunsystem der Peripherie beeinflussen (Dietzschold und Richt, 2002). Chemokine regulieren die Einwanderung von Leukozyten während entzündlichen und infektiösen Erkrankungen (Banisadr et al., 2005). Beispielsweise konnten Phillips und Lampson 1999 zeigen, dass die T-Zell-Einwanderung durch lokale Interferon γ – Injektion deutlich verstärkt werden kann (Phillips und Lampson, 1999). Interferon γ kann ebenso wie TNF α die Ausbildung von MHC II auf Astrozyten induzieren (Dong und Beneviste, 2001). Die bei Multiple Sklerose gebildeten Chemokine CCL3 und CCL5 erleichtern die T-Zell Migration durch die Blut-Hirn-Schranke (Man et al., 2008).

Zytokine und andere Botenstoffe sind aber auch an der Regulation der Immunantwort im gesunden ZNS wesentlich beteiligt. Chemokine werden von glialen Zellen und Neuronen produziert und dienen der interzellulären Kommunikation (Banisadr et al., 2005).

Ausgesandte Chemokine haben auch einen wesentlichen Einfluss auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Verschiedene Stoffe wie TGF β , GDNF, bFGF, IL-6 und Steroide können durch Nachahmung glialer Funktionen die Bildung der Blut-Hirn-Schranke induzieren (Abbott, 2002). Neuronaler Wachstumsfaktor (NGF) wurde als Faktor beschrieben, der zur natürlichen Immunsuppression im ZNS entscheidend beiträgt und dadurch in Versuchen auch schützend gegen die Entwicklung von EAE gewirkt hat (Villoslada et al., 2000).

Der Zugang von Zellen in das ZNS ist nicht nur streng reglementiert, im Parenchym treffen die Lymphozyten zudem auf ein feindliches Mikromilieu: T-Zellen im ZNS sterben rasch durch apoptotische Mechanismen (Bauer et al., 1998). Die Expression von FasL auf Neuronen und anderen ZNS-Zellen führt zur antigen-unabhängigen Apoptose von Fas-positiven T-Zellen (Bechmann et al., 1999; Flügel et al., 2000; Bauer et al., 1998). Weiterhin scheint die Freisetzung von TNF α ein zentraler Mechanismus zur Beschränkung von Inflammation im ZNS zu sein (Gold et al., 2007).

Lymphabfluss

Obwohl im ZNS keine Lymphgefäße im eigentlichen Sinne existieren, findet dennoch ein Lymphabfluss in die zervikalen Lymphknoten statt (Cserr and Knopf, 1992), der die Antikörperbildung in den zervikalen Lymphknoten beeinflussen kann (Harling-Berg et al., 1989; Knopf et al., 1995). Entlang des Bulbus olfactorius und wahrscheinlich auch entlang der anderen Hirnnerven gelangen ZNS-Antigene in die Lymphknoten, wo sie auf T-Zellen treffen und diese stimulieren/aktivieren (Weller et al., 1992).

Alle Hirnflüssigkeiten (extrazelluläre Flüssigkeit, interstitielle zerebrale Flüssigkeit, zerebrospinale Flüssigkeit) stehen in Verbindung und verlassen den subarachnoidalen Raum durch die arachnoidalen Granulationen sowie entlang des Nervus olfactorius durch die kribriiforme Platte ins Blut und in die zervikalen Lymphknoten (Oehmichen, 1978; Bradbury und Westrop, 1983; Kida et al., 1995). Dabei gelangen ca. 40% der zerebrospinalen Flüssigkeit und 50% der interstitiellen Flüssigkeit in die zervikalen Lymphknoten (Bradbury und Cole, 1980; Yamada et al., 1991, Boulton et al., 1998).

Somit scheint festzustehen: Enzephalogene Antigene können das ZNS verlassen und mit dem Immunsystem interagieren (Hickey, 2001).

Antigen, das in die zerebrospinale Flüssigkeit injiziert wurde, konnte nach einigen Stunden in den zervikalen Lymphknoten nachgewiesen werden. Nach einigen Tagen konnten in den Lymphknoten Antigenspezifische B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Drainage von Antigen aus dem Gehirn in die zervikalen Lymphknoten und die Initiierung einer antigenspezifischen Immunantwort in diesem Rahmen (Walter et al., 2006). Diese initial periphere Immunantwort (afferenter Arm) wird in den zervikalen Lymphknoten induziert und ist durch eine starke Antikörperreaktion (IgG) charakterisiert, die eine Reaktion der zytotoxischen T-Zellen einleitet (Harling-Berg et al., 2002).

Der afferente Arm der zerebralen Immunantwort besitzt keinen zellulären Transportmechanismus für Antigene und ist dadurch deutlich eingeschränkt und stark abhängig von dem Transport von Antigenen in die zervikalen Lymphknoten in löslicher Substanz (Galea et al., 2007). Der Mangel einer zellulären Route für Antigen aus dem Gehirn in Lymphknoten wird als einer der Hauptfaktoren des Immunprivilegs gesehen (Galea et al., 2007).

1.4. Lymphozyten als Teil der Immunabwehr im ZNS

1.4.1. Herkunft, Subtypen und Aufgaben im peripheren Immunsystem

Herkunft von lymphozytären Zellen

Lymphozyten stammen wie alle weiteren Blutzellen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab (Blom und Spits, 2006).

Im ersten Entwicklungsschritt differenzieren sich diese pluripotenten Zellen zu Stammzelllinien mit eingeschränktem Potential, z.B. zur gemeinsamen lymphatischen (lymphoiden) Vorläuferzelle, die im Verlauf zu einem der drei lymphozytären Subtypen B-Lymphozyten, T-Lymphozyten oder NK-Zellen (natürliche Killer – Zellen = Non-B-non-T-Zellen) reift.

Dieser Entwicklungsschritt findet in den zentralen oder primären lymphatischen Geweben statt und ist abhängig vom Ort der Reifung: B-Lymphozyten reifen im Knochenmark („B“ für Bone-marrow) und T-Zellen entwickeln sich im Thymus („T“ für Thymus). Es besteht Konsensus, dass die Entwicklung der NK-Zellen hauptsächlich im Knochenmark stattfindet – ein Teil der Entwicklung scheint jedoch in den Lymphknoten vonstatten zu gehen (Freud und Caligiuri, 2006).

Morphologie der Lymphozyten

Morphologisch sind naive Lymphozyten kleine, runde Zellen (Durchmesser: 7-9 μm) mit einem großen Zellkern und schmalem Zytoplasmasaum. Durch ihren chromatinreichen Zellkern erscheinen sie basophil (siehe Abbildung 1).

Eine Aktivierung der Lymphozyten durch Antigenkontakt oder durch Zytokin vermittelte Signale anderer Immunzellen führt zu einer Größenzunahme und zu einer Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zytoplasmas. Das Chromatin wird dekompensiert und damit lichtmikroskopisch aufgelockert (Janeway et al., 2005, S. 20) (siehe Abbildung 2).

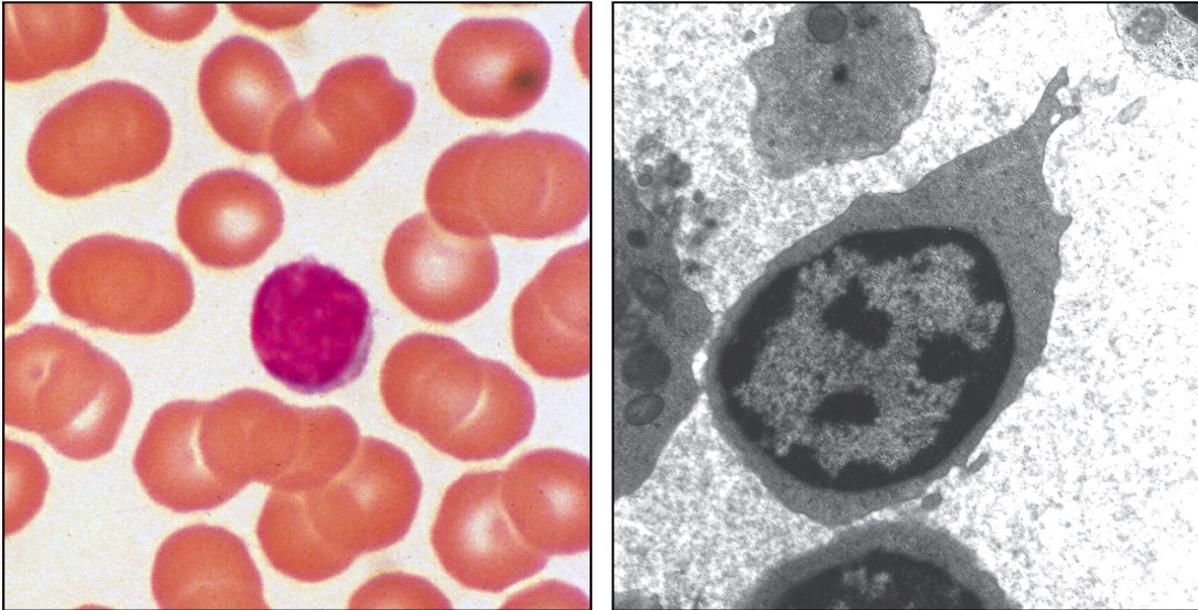


Abbildung 1: Morphologie von Lymphozyten anhand Beispielen aus Licht- und Elektronenmikroskopie (Janeway et al., 2005)

Entwicklung und Erlangung von Immunkompetenz

Solange die B- und T-Zellen noch keinen Antigenkontakt hatten, bezeichnet man diese inaktiven Lymphozyten als nativ oder ungeprägt. Native Lymphozyten zirkulieren auf der Suche nach ihrem Antigen zwischen Blut und Lymphflüssigkeit.

Sobald die Lymphozyten auf ihr spezifisches Antigen treffen (präsentiert von Antigen präsentierenden Zellen, vor allem im peripheren/sekundären lymphatischen Gewebe, hauptsächlich durch dendritische Zellen in den Lymphknoten) werden sie zu Effektorzellen und verlassen das lymphatische Gewebe durch das efferente lymphatische Gefäß. Diese aktivierten Lymphozyten – auch Lymphoblasten genannt – sind mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 12 μm größer als ihre nativen Vorläufer (siehe Abbildung 2). Sie zirkulieren auf der Suche nach ihrem Antigen weiterhin durch den Körper und werden nicht mehr in den Lymphknoten aufgehalten.

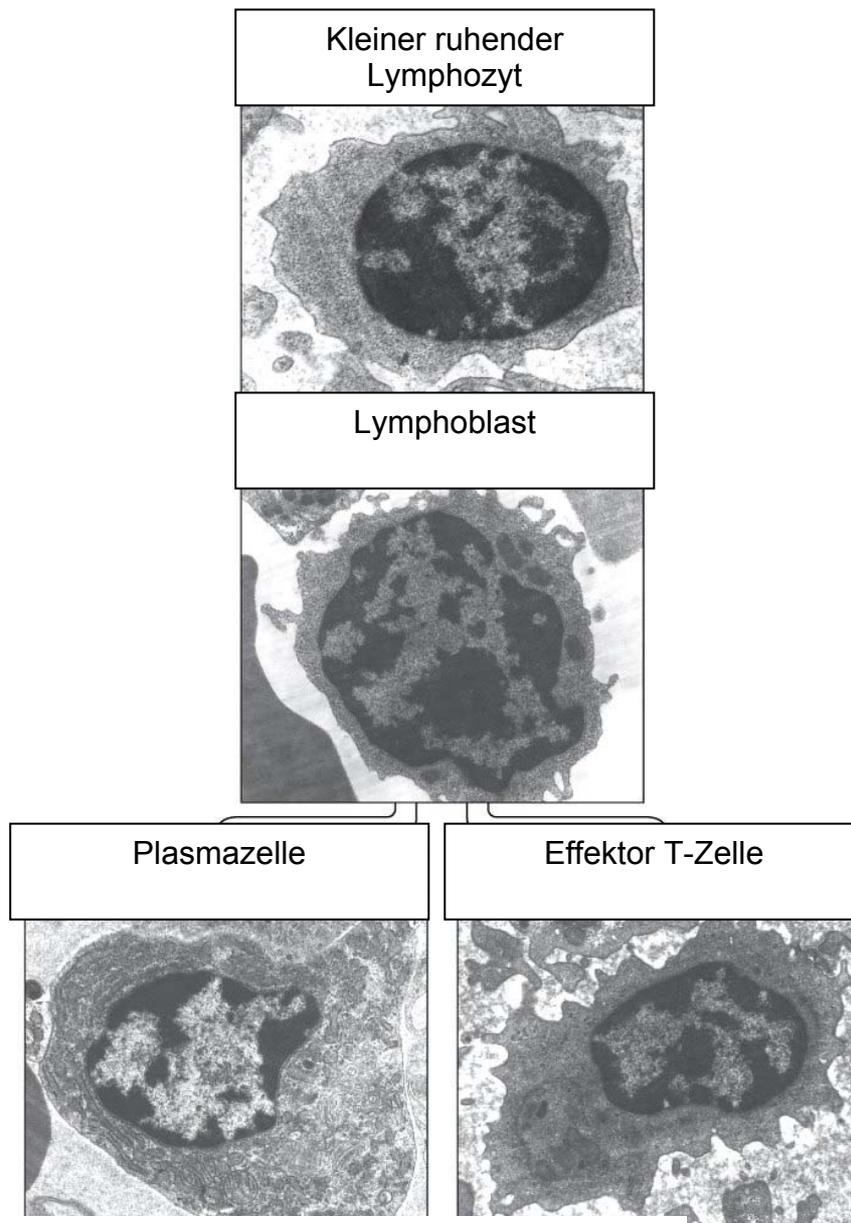


Abbildung 2: Morphologie und Entwicklung von Lymphozyten (Elektronenmikroskop) (nach Janeway et al., 2005, S. 20)

Um ihre Rolle der Gewebsüberwachung wahrnehmen zu können, müssen Lymphozyten in der Lage sein, die Blutzirkulation zu verlassen und durch die soliden Gewebe des Körpers zu patrouillieren (Adamson et al., 1999). Auf diesen Prozess der Extravasation wird später noch genauer eingegangen.

Sobald sie auf ihr spezifisches Antigen treffen, üben sie ihre jeweilige Effektorfunktion aus.

Lymphozyten-Subtypen

Die verschiedenen Lymphozytenpopulationen unterscheiden sich in ihrer Funktion und daraus folgend in ihrer Präsentation von Oberflächenantigenen. Dieses unterschiedliche Expressionsmuster macht man sich in der Differenzierung der Subpopulationen zu nutze, da rein morphologisch keine sichere Abgrenzung zwischen den Subtypen (Ausnahme: Plasmazelle) möglich ist. Man bedient sich spezifischer Oberflächenmarker, den so genannten „Cluster of Differentiation“ (CD) um die verschiedene Lymphozyten-Subtypen zu differenzieren.

T-Lymphozyten

Die Gesamtheit der aus dem Thymus stammenden Lymphozyten wird als T-Zell-Population bezeichnet. Diese Population ist gekennzeichnet durch die Bildung eines spezifischen Oberflächenantigens, dem T-Zell-Rezeptor (TCR). Dieser Rezeptor wird in der CD-Nomenklatur als CD3 bezeichnet und wird zur Markierung und Bestimmung der Gesamt-T-Zellpopulation eingesetzt. Der TCR dient zur Erkennung von körperfremdem Antigen.

Die Aktivität der T-Zellen ist auf die Kontrolle von Virus-befallenen Körperzellen, sowie auf die Abwehr von Pilzen und Parasiten gerichtet. T-Zellen spielen außerdem bei der Abstoßung von fremdem Gewebe eine Rolle und helfen bei der humoralen Antikörpervermittelten Immunantwort. T-Zellen gehören der spezifischen, zellulären Immunität an.

Die Gruppe der CD3-positiven Lymphozyten besteht aus mehreren Untergruppen, auf die im Folgenden eingegangen wird.

CD4-positive T-Lymphozyten

Die CD4-Oberflächenantigen exprimierenden T-Lymphozyten können ihrerseits in drei Subtypen mit unterschiedlichen Funktionen differenziert werden. Um eine spezifische Antigenerkennung zu gewährleisten, reagieren CD4-Lymphozyten nur auf Antigene, die gemeinsam mit MHC-Proteinen der Klasse II präsentiert werden (Bevan, 2004).

So genannte Th1-Zellen werden auch als inflammatorische T-Zellen bezeichnet. Infektionen durch intrazelluläre Bakterien lösen bei ihnen nach Prozessierung und Darbietung durch Makrophagen die Ausschüttung von Makrophagen aktivierenden

Einleitung

Zytokinen, vor allem von Interferon γ , aus und führen dadurch zu einer Entzündungsreaktion (Janeway et al., 2005, S.31).

Th2-Zellen werden auch als Helferzellen bezeichnet. Sie wirken durch die Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen, vor allem von Interleukin (IL) 4, unterstützend auf die Stimulation von B-Zellen. Sie tragen dadurch entscheidend zur Aktivierung der humoralen (nicht-zellulären) Abwehr bei (Seder und Ahmed, 2003).

Der dritte Helferzelltyp sind die regulatorischen Zellen vom CD4-Typ. Diese Zellen zeichnen sich meist durch eine Ko-Expression von CD25 aus. Bis jetzt konnte kein spezifischer Marker ausgemacht werden (Yi et al., 2006). Diese regulatorischen CD4-Lymphozyten spielen hauptsächlich in der frühen und primären Phase der Immunantwort eine Rolle und führen zu einer unspezifischen Suppression. Sie kommen natürlicherweise vor und benötigen kein Priming vor Inkrafttreten ihrer Funktionen (Jiang und Chess, 2004).

CD8-positive T-Lymphozyten

CD8-positive Lymphozyten zeichnen sich durch Expression des Oberflächenantigens CD8 aus, das als Ko-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors (TCR) dient. Zu den CD8-positiven Lymphozyten zählen die zytotoxischen T-Zellen, die regulatorischen/immunsuppressiven CD8-positiven T-Zellen und der CD8-Gedächtniszelltyp.

Die Funktion der zytotoxischen T-Zellen ist die spezifische zelluläre Abwehr. Mit dem T-Zellrezeptor können die zytotoxischen T-Zellen fremde Antigene auf Körperzellen erkennen und töten. Bedingung für die Antigenerkennung ist deren Darbietung durch MHC I Moleküle, der auf allen zellhaltigen körpereigenen Zellen vorhanden sind (Neumann et al., 2002). Somit ergibt sich ein klarer Unterschied zu den CD4-Lymphozyten, der die verschiedenen Funktionen verdeutlicht: CD4-Zellen erkennen Antigen, das von professionellen Antigen präsentierenden Zellen dargeboten wird (MHC II), während CD8-Zellen auf jedes fremde Antigen reagieren, das auf einer körpereigenen Zelle (MHC I) erscheint. Durch die Produktion und Freisetzung von Zytokinen (TNF α , Interferon γ) und durch zytolytische Mechanismen (Perforin- und Granzymfreisetzung) (Trapani und Smyth, 2002) können die zytotoxischen T-Zellen infizierte körpereigene Zellen zerstören und intrazelluläre Infektionen (viral und bakteriell, bestimmte Protozoeninfektionen, z.B. *Toxoplasma gondii*) abwehren.

Einleitung

Einige wenige zytotoxische T-Zellen entwickeln sich nach Antigenkontakt zu Gedächtnis- oder Gedächtnis-Zellen, die jahrelang im Organismus überleben und bei erneutem Angriff ihres Antigens schnell und effektiv reagieren können (Seder und Ahmed, 2003). CD8-T-Zellen spielen auch in der Regulation der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität eine wichtige Rolle (Johnson et al., 2007). So zeigte die Arbeitsgruppe um Tan und Hurst an einem in vitro Blut-Hirn-Schrankenmodell, dass aktivierte T-Zellen während neuroinflammatorischen Prozessen den Zelltod von Endothelzellen an der Blut-Hirn-Schranke direkt und zellzahlabhängig induzieren und die Integrität der Blut-Hirn-Schranke durchbrechen können (Tan et al., 2002).

Die CD8-positiven regulatorischen T-Zellen (Treg) hingegen regulieren die Immunantwort. Daher auch ihr zweiter Name: Suppressorzellen. Suppressorzellen sind essentielle Teile der Kontrolle von Autoimmunität (Jiang und Chess, 2004). Für diese Suppressorzellgruppe existieren bis jetzt keine spezifischen Marker – eine Vielzahl von unterschiedlichen Ko-Expressionen wurden beschrieben, unter anderem CD25, CD122, CD45RC high/low, CD28-negativ, CD75s, CD $\alpha\alpha$ + (Tang et al., 2005), sowie eine verminderte Zytokin-Expression (Trajkovic et al., 2004). Eine genaue Charakterisierung und Identifizierung ist deshalb schwierig. Zwei Haupt-Kategorien konnten differenziert werden: antigenspezifisch und nicht-antigenspezifisch (Tang et al., 2005). Nicht-antigenspezifische CD8-Suppressorzellen entwickeln sich nach Interleukin 2 Exposition aus CD8-positiven CD28-negativen Zellen (Filaci et al., 2004). Die Entwicklung von CD8-positiven Suppressorzellen scheint bei Mäusen durch Qa1 (menschliches Homolog ist HLA E) auf aktivierten CD4-positiven T-Zellen induziert zu werden (Sarantopoulos et al., 2004). CD8-positiven Tregs werden durch IL4 und IL12 gefördert. Sie produzieren IL10 und bilden ein einzigartiges Muster an Oberflächenproteinen mit gleichzeitiger Expression von Aktivierungsmarkern und primitiven Zellmarkern aus. Ihre Aufgabe ist die Blockierung der Aktivierung von naiven oder Effektorzellen, weiterhin supprimieren sie IgG/IgE Antikörper Antworten und Graft-versus-host-Reaktion in vivo. Die Suppression wird durch direkten T-Zell zu T-Zell Kontakt initiiert und antagonisiert T-Zellrezeptor Signale (Noble et al., 2006). Den Suppressorzellen vom CD8-Typ wird eine entscheidende Rolle in der Verhinderung von Exazerbation und Relaps im Tiermodell der Multiplen Sklerose (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis = EAE) zugesprochen (Sarantopoulos et al., 2004).

Einleitung

Sowohl CD8-positive als auch CD4-positive Suppressorzellen scheinen zum Teil durch Kontakt mit Astrozyten induziert zu werden. Wichtige Faktoren der Suppressorfunktion scheinen diesbezüglich hitzesensible T-Zellfaktoren (außer TGF β und IL10) zu sein (Trajkovic and al., 2004). Insgesamt sind die Funktionsweisen der verschiedenen Subgruppen nur teilweise bekannt, selbst in der genauen Differenzierung in funktionelle oder phänotypische Subgruppen besteht noch keine Einheit.

B-Lymphozyten

Die im Knochenmark ausgebildeten B-Zellen lassen sich über die Oberflächenmarker CD19 und CD20 (Ko-Rezeptoren) bestimmen. B-Lymphozyten sind als Hauptzellen der humoralen Abwehr essentieller Bestandteil der spezifischen zellulären Immunantwort.

Nach ihrer Aktivierung durch Antigenkontakt (mit Unterstützung der Th2-Lymphozyten) bzw. durch unmittelbaren Kontakt mit Zytokinen entwickeln sie sich zu Plasmazellen (MacLennan, 1994), die eine typische Morphologie aufweisen: es sind ovale Zellen (Durchmesser 14-20 μm) mit ungranuliertem Zytoplasma (reich an endoplasmatischem Retikulum u. Ribosomen), gut entwickeltem Golgi-Apparat u. kleinem, exzentrisch gelegenem Kern mit der typischen Radspeichenstruktur des Chromatin (siehe Abbildung 2).

Plasmazellen produzieren monoklonale Antikörper, die unter anderem durch Opsonierung von extrazellulären Erregern deren Phagozytose stimulieren und dadurch entscheidend zur Immunantwort beitragen. Weitere Funktionen sind die Bindung von fremden und körpereigenen Antigenen und deren Neutralisation (Janeway et al., 2005, S.368). Die Antigenspezifität der gebildeten Antikörper entspricht dem Rezeptor des B-Zell-Klons, aus dem die Plasmazelle entstanden ist.

Nach Aktivierung entwickeln sich einige B-Zellen zu Gedächtniszellen, die nicht an der akuten Immunreaktion teilnehmen. Sie dienen im Fall eines erneuten Kontakts mit dem entsprechenden Antigen als schnell rekrutierbare Reserve, die eine schnelle Antikörper basierte Immunantwort bereitstellen kann.

Natürliche Killer Zellen (NK)

Diese NK-Zellen gehören zur angeborenen Immunabwehr und wirken antigenunspezifisch. Menschliche NK-Zellen machen in etwa 15% der zirkulierenden Lymphozyten aus (Cooper et al., 2001).

NK-Zellen tragen zur Abwehr von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen bei – auch bei Leishmanien- und Listerieninfektionen spielen sie eine wichtige Rolle. Zusätzlich scheinen NK-Zellen auch eine Rolle als regulatorische Zellen zu spielen (Jiang und Chess, 2004).

Durch Freisetzung von zytotoxischen Granula (Granzym oder Perforin), die durch an Zielzellen gebundene Antikörper ausgelöst wird, sobald diese mit den Fc-Rezeptoren (CD16) der NK-Zellen in Kontakt treten, werden die Zielzellen getötet. Die Proliferation der NK-Zellen unterliegt der Regulation durch T-Lymphozyten (Helfer- u. Suppressorzellen). Ihre Aktivität wird v. a. durch Interferone sowie Interleukine u. a. Immunmodulatoren stimuliert.

NK-Zellen besitzen die Fähigkeit, Zielzellen ohne vorhergegangene Sensibilisierung zu lysieren, und spielen deshalb eine wichtige Rolle in der angeborenen Abwehr (Cooper et al., 2001). Es können zwei Untergruppen von NK-Zellen unterschieden werden: CD56-stark exprimierende immunregulatorische NK-Zellen und CD56-schwach exprimierende zytotoxische Zellen (Farag und Caligiuri, 2006).

NK-Zellen verfügen weder über die Oberflächenmerkmale von B-Zellen noch von T-Zellen und werden deshalb auch als Nullzellen bezeichnet. Morphologisch stellen sich Nullzellen als große Lymphozyten mit zahlreichen zytoplasmatischen Granula dar (Abbildung 3). Durch ihr Antigenprofil kann der NK-Zelltyp von anderen Lymphozyten abgegrenzt werden (CD3-negativ, CD16-positiv und CD56-positiv) (O'Shea und Ortaldo, 1992), wobei es verschiedene Subtypen gibt und nicht alle NK-Zellen den typischen Phänotyp ausbilden (Whiteside und Herbermann, 1994). Eine eindeutige Darstellung ist nur durch Mehrfachfärbungen möglich, da CD16, CD56 und CD57 auch auf einer Minderheit von T-Zellen zu finden sind.

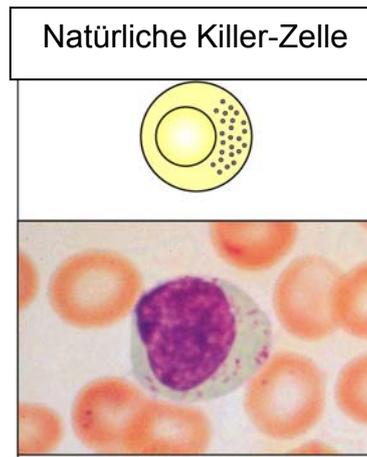


Abbildung 3: Natürliche Killer Zelle (Lichtmikroskop) (nach Janeway et al., 2005, S.6)

1.4.2. Wege der Lymphozyten ins ZNS

Die Lymphozyten können über verschiedene Wege ins ZNS gelangen: über die Blut-Hirn-Schranke in den parenchymalen perivaskulären Raum oder direkt über postkapilläre Venulen an der pialen Oberfläche in den subarachnoidalen Raum, bzw. in den Virchow-Robin-Raum. Ein dritter Weg geht über die Blut-Liquorschranke in den zerebrospinalen Liquor und von dort über die Hirn-Liquor-Schranke ins Hirnparenchym (Ransohoff et al., 2003).

Außer an den zirkumventrikulären Organen ist das gesamte ZNS von der sogenannten Blut-Hirn- oder Hirnliquorschranke umgeben.

Trotzdem können Leukozytenpopulationen abhängig von der Expression von Adhäsionsmolekülen während Neuroinflammation verschiedene Wege an ausgesuchten Stellen ins ZNS-Parenchym nehmen (Engelhardt und Ransohoff, 2005).

Da die Blut-Hirn-Schranke im Vergleich zur Blut-Liquor-Schranke eine ca. 5000-fach größere Fläche besitzt, wird angenommen, dass der Großteil der Migration vom Blut ins ZNS-Parenchym über diesen Weg geschieht (Pardridge, 1999).

Blut-Hirn-Schranke

Durch die Blut-Hirn-Schranke wird das ZNS vor plasmatischen Schwankungen und zirkulierenden Substanzen wie Neurotransmittern, die die neuronale Funktion stören könnten, geschützt. Die Blut-Hirn-Schranke bildet auch die Voraussetzung für eine homeostatische Regulation des Mikromilieus, das für eine konstante und koordinierte Neuronentätigkeit unerlässlich ist (Abbott, 2002).

Das vaskuläre System des ZNS stammt von kapillären Endothelzellen ab, die vom perineuralen vaskulären Plexus aus in das frühe Neuroektoderm des Embryos eingedrungen sind. Die Expression von den VEGF Rezeptoren 1 und 2 (flt-1 and flk-1) ebenso wie den Angiopoetinrezeptoren (tie-1 und tie-2) ist während der Angiogenese im ZNS im Vergleich zum Erwachsenenendothel deutlich erhöht. Diese Rezeptoren werden für die regelrechte Ausbildung des Gefäßsystems benötigt und besonders der Rezeptor Tie 2 ist essentiell für die Angiogenese des ZNS, da durch diese Faktoren das Zellwachstum der Endothelzellen, deren Permeabilität und Differenzierung bestimmt wird (Risau et al., 1998).

Die Blut-Hirn-Schranke besteht im Gegensatz zu den meisten vaskulären Endothelien aus nicht-fenestrierten Endothelzellen, die durch zusätzliche sehr komplexe Tight-junctions verbunden sind (Reese und Karnovsky, 1967). Diese Tight-junctions bilden die strukturelle Basis für parazelluläre Undurchlässigkeit und den hohen elektrischen Widerstand der Blut-Hirn-Schranke (Risau et al., 1998).

Diese hoch-spezialisierten Endothelzellen besitzen charakteristischerweise auch keine pinozytotischen Vesikel (Man et al., 2008), dafür jedoch spezialisierte Transportsysteme (Risau et al., 1998). Abluminal sind mikrovaskuläre endotheliale Zellen im ZNS mit einer Basalmembran sowie einer extrazellulären Matrix aus Kollagenen, Elastin, Fibrillin, Laminin und Fibronectin assoziiert (Hayashi et al., 1997).

Die strukturelle und funktionale Integrität scheint unter anderem durch Astrozyten beeinflusst zu werden (Risau und Wolburg, 1990). Astrozyten sind große, zur Phagozytose befähigte, sternförmige Zellen mit zahlreichen Zellfortsätzen, die mit Nervenzellen u. Blutgefäßen in Verbindung stehen und die sog. Gliagrenzmembran bilden und damit zur Bildung der Blut-Hirn-Schranke beitragen. Die genaue

Einleitung

Entstehung und Reifung der Blut-Hirn-Schranke wird teilweise noch stark diskutiert – in letzter Zeit wird auch eine verstärkte Bedeutung der umgebenden Neuronen für die Reifung der Blut-Hirn-Schranke angenommen (Haseloff et al., 2005). Durch die Tight-junctions (einem Maschenwerk aus interendothelialen Proteinen, z.B. Occludin und Claudine (Furuse et al., 1993; Morita et al., 1999) wird die Blut-Hirn-Schranke für Moleküle und Zellen zum Großteil undurchlässig (Adamson et al., 2002). Der Transport von Molekülen durch die Blut-Hirn-Schranke kann in passiver und aktiver Weise, also durch Diffusion oder mittels Transportern erfolgen.

Die Diffusion von Molekülen durch die Blut-Hirn-Schranke ist abhängig von ihrem Molekulargewicht, ihrer Ladung und ihrer Lipophilie (Cornford und Hyman, 1999). Verallgemeinernd lässt sich sagen, dass nicht-ionisierte Moleküle mit niedrigem Gewicht und starker Lipophilie am besten durch die intakte Blut-Hirn-Schranke diffundieren können (Scheld, 1989).

Bei Entzündungen im ZNS-Gewebe, aber auch in der Peripherie, kann es durch die Zirkulation von Zytokinen im Blut (wie beispielsweise TNF α) zu Veränderungen an der Blut-Hirn-Schranke bis hin zu einem Zusammenbruch kommen (Hickey, 2001). Für einige andere Erkrankungen wie virales hämorrhagisches Fieber, HIV, Demenzen, Schock und zerebrale Malaria konnte eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke gezeigt werden (Johnson et al., 2007). Selbst Diabetes und entzündlicher Schmerz hatten im Tiermodell schädliche Auswirkungen auf die Blut-Hirn-Schranke (Hawkins und Egleton, 2008).

Die Migration von Lymphozyten soll im Folgenden detailliert geschildert werden.

Migration der Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke

Um Eintritt ins Gehirngewebe über die Blut-Hirn-Schranke zu bekommen, müssen die Lymphozyten entweder die Tight-junctions durchqueren (Diapedese) oder durch den Zellkörper der Endothelzelle migrieren (Emperipolesis). Nach langen Debatten über den Eintrittsweg hat sich mittlerweile größtenteils die Meinung durchgesetzt, dass die Diapedese der Haupt-Eintrittsmechanismus der Lymphozyten ins ZNS ist (Aurrand-Lions et al., 2002), obwohl festzuhalten bleibt, dass beide Wege der Extravasation für Leukozyten möglich sind und benutzt werden (Engelhardt und Wolburg, 2004).

Einleitung

Die Mechanismen der Extravasation der Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke scheinen in Gesundheit und Krankheit zu differieren (Kleine und Benes, 2006). Bei einer allgemeinen Entzündungsreaktion oder Immunkrankheit im Körper kommt es zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Leukozyten (Fabry et al., 1994; Adamson et al., 1999). Wobei sich zeigte, dass es bei einer Entzündung nicht zu einer Ansammlung von Lymphozyten auf der vaskulären Seite der Blut-Hirn-Schranke kam, sondern dass sich die Durchtrittsquote nach der initialen Adhäsion erhöhte (Lees et al., 2006). Oft wurde jedoch in den vorliegenden Publikationen nicht eindeutig zwischen Gesundheit und Krankheit unterschieden.

Die Blut-Hirn-Schranke umfasst sowohl Kapillargefäße als auch post-kapilläre Venulen, wo der Großteil der Leukozytenextravasation stattfindet (Engelhardt und Ransohoff, 2005). An der Blut-Hirn-Schranke werden sehr wenige Adhäsionsmoleküle exprimiert, wodurch die Lymphozyten zum Großteil im Blutstrom fortgespült werden und keine Gelegenheit bekommen, sich über die Blut-Hirn-Schranke ins Hirngewebe zu bewegen (Carrithers et al., 2000).

Die Emperipolesis ist ein alternativer Weg für die Migration durch das Endothel – nicht durch den Interzellularspalt sondern direkt durch den Zellkörper gelangt der Lymphozyt ins Hirngewebe. Dieser transzelluläre Weg der Extravasation beginnt in ähnlicher Weise wie bei der Diapedese mit einer Adhäsion, daraufhin entwickelt die Endothelzelle jedoch mikrovillöse Ausstülpungen, mit denen sie den Lymphozyten umschließen und so durch den Endothelzellkörper zur abluminalen Seite durchschleusen kann (Wolburg et al., 2004).

Bei der Diapedese als parazellulärer Route gelangen die Lymphozyten nach einem mehrstufigen Prozess durch die Tight-junctions ins Gewebe (Piccio et al., 2002), wobei die Endothelzellen aktiv zur Extravasation von inflammatorischen Leukozyten beitragen können (Man et al., 2007). Der initiale Kontakt eines im Gefäß zirkulierenden Lymphozyten wird durch Interaktion eines glykolisierten Liganden auf den Leukozyten mit endothelständigen Selektin-Molekülen hergestellt (Bindung = Tethering). Durch die Strömung des Blutstroms und durch α -4-Integrin der Endothelzellen kommt es zum Prozess des Abrollens (rolling) entlang der Gefäßwand (Springer, 1994; Johnston et al., 2000; Man et al., 2007).

Einleitung

Durch eine Chemokin-Rezeptor-Aktivierung kommt es durch einen G_α -Signalweg zu einem schnellen intrazellulären Signal, das eine Umwandlung in einen hoch-affinen Status des Leukozyten bewirkt (Man et al., 2007). Die ausgebildeten hoch-affinen Integrine interagieren mit den endothelialen Rezeptoren VCAM-1 und ICAM-1, bzw. alternativ mit FN CS-1, und schaffen dadurch eine feste Bindung (Man et al., 2007). Das endotheliale junctionale Adhäsionsmolekül 1 (JAM-1) scheint durch die Interaktion mit Integrin $\alpha_L\beta_2$ LFA-1 ebenso eine Rolle zu spielen (Ostermann et al., 2002). Nach der Bindung des Leukozyten folgt eine Suche nach interendothelialen Kontaktstellen, was „Locomotion“ genannt wird (Schenkel et al., 2004). Dabei kommt es zu einer Ausbildung von Protusionen, die die abluminale Umgebung nach chemotaktischen Reizen absuchen. Die Scherkraft spielt bei der Ausbildung der Protrusionen eine entscheidende Rolle und trägt somit positiv zur leukozytären Transmigration bei (Ransohoff, 2007). Nun penetrieren die Leukozyten die endotheliale Basalmembran in Richtung perivaskulären Raum. Durch die Bildung von verschiedenen Formen von Matrix-Metalloproteinase (MMP), einer Zink-enthaltenden Endoproteinase, können T-Zellen die Migration durch die Basalmembranen erleichtern (Sasaki et al., 2004).

Neuerdings zeigten sich jedoch auch Hinweise, dass die Anbindung von T-Lymphoblasten in der weißen Substanz des Rückenmarks ohne Rolling in einem „immediate-capture event“ (Man et al., 2007) stattfinden kann (Vajkoczy et al., 2001; Engelhardt, 2006).

Bereits 2001 beschrieben Wingerchuk et al., dass Moleküle wie VCAM, ICAM, VLA-4 und LFA-1 in der frühen T-Zell-Transmigration keine Rolle zu spielen scheinen (Wingerchuk et al., 2001). Eine Interaktion zwischen Leukozyt und Endothelzellen, bzw. Rolling wurde in gesunden Mäusen nicht beobachtet (Ransohoff et al., 2003). Nur nach Aktivierung der Gefäße konnte eine Interaktion des Endothels mit aktivierten Lymphozyten nachgewiesen werden (Ransohoff et al., 2003). P- und E-Selektine werden beispielsweise auf Endothelzellen nur bei akuten und chronischen inflammatorischen Prozessen ausgebildet, während L-Selektin auf den meisten zirkulierenden Leukozyten zu finden ist (Man et al., 2007). Auf nicht-aktivierten Endothelzellen ist somit die Voraussetzung für Rolling und Tethering nicht gegeben, so dass angenommen wurde, dass möglicherweise die Lymphozytentransmigration in Gesundheit ohne Rolling geschieht (Kleine und Benes, 2006).

Einleitung

Die folgende Abbildung (Abbildung 4) zeigt eine schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke (nach Wingerchuk et al., 2001).

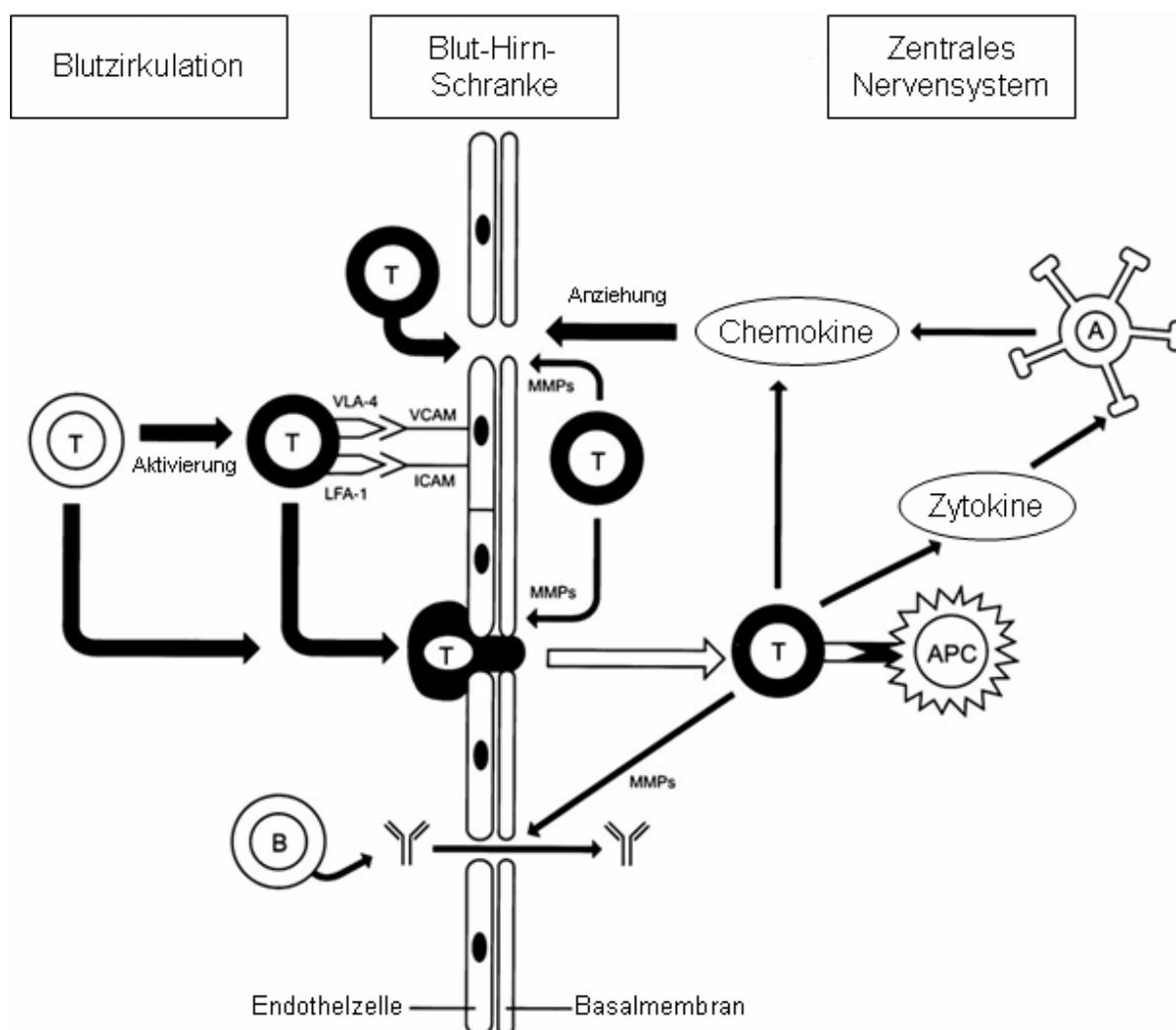


Abbildung 4: Bluthirnschranke nach Wingerchuk et al., 2001

Voraussetzungen

Unabhängig vom Mechanismus ist die Extravasation in das Hirnparenchym in erster Linie vom Aktivierungszustand des Lymphozyten abhängig und – interessanterweise von seiner Antigen-spezifität und von seinem Phänotyp unabhängig. Wegweisende Experimente von William F. Hickey wiesen dies eindrücklich nach: Die Ergebnisse zeigten unmissverständlich, dass nach Injektion alle T-Zell-Typen außer nicht aktivierten, ruhenden T-Zellen im ZNS in großen Mengen nachweisbar waren und dass nur diejenigen, die gegen das im ZNS auftretende MBP geimpft waren, dort auch länger als wenige Stunden verweilten (Hickey et al., 1991).

Einleitung

Nur kürzlich aktivierte Lymphozyten scheinen die Blut-Hirn-Schranke überqueren zu können (Greenwood und Calder, 1993). Die transendotheliale Migration von Lymphozyten hängt also von der Lymphozyten-Aktivierung ab, die durch den T-Zell- und Interleukin 2 – Rezeptor (CD25) signalisiert wird (Pryce et al., 1997; Wekerle, 2002).

Das bedeutet, dass in vivo nur Antigen-spezifische, IL-2 abhängige T-Zellen die Fähigkeit besitzen, ins ZNS zu migrieren (Hickey, 1999).

In vitro-Studien haben gezeigt, dass CD4-positive T-Zellen am effektivsten die Blut-Hirn-Schranke überqueren können (Fabry et al., 1994), bzw. dass B-Zellen leichter durch menschliche Endothelzellen aus den Gehirngefäßen migrieren können als T-Zellen (Alter et al., 2003).

Nachdem im Ratten-Rückenmark eine deutliche Übermacht von CD8-positiven Lymphozyten gefunden worden war, postulierte man, dass CD8-Zellen eventuell aufgrund ihres Chemokinrezeptors CCR9, der auf CD4-Lymphozyten nicht exprimiert wird, leichter als andere Lymphozytensubtypen die Blut-Hirn-Schranke überqueren können (Bradl et al., 2005).

Eine eindeutige Aussage lässt sich anhand der bestehenden Datenlage diesbezüglich nicht treffen.

Blut-Liquor-Schranke

Die Blut-Liquor-Schranke wird vom Epithel des Plexus choroideus gebildet, wobei ebenso wie bei der Blut-Hirn-Schranke Tight-junctions die Epithelzellen miteinander verbinden. Im Gegensatz zur Blut-Hirn-Schranke sind allerdings die Kapillaren fenestriert (Kim et al., 2006). Die Migration über die Blut-Liquor-Schranke ist ein mehrstufiger Prozess, der mit dem Übertritt der Leukozyten durch die choroidalen Plexusstroma-Gefäße ins Plexusstroma beginnt (Man et al., 2007).

Nach dem Austritt aus dem Mikrogefäß in das Plexusstroma müssen die Zellen durch das Choroidepithel mit einer Tight-junction hindurchmigrieren, um in den zerebrospinalen Liquor zu gelangen (Kleine und Benes, 2006). Nach initialem Rolling und Tethering an P- und E-Selektin Molekülen (Kivisäkk et al., 2003) kommt es außerdem zu L-Selektin-CD34 und ICAM-1 – LFA-1 Interaktionen (Kleine und Benes, 2006).

Im CSF von gesunden Individuen sind ca. 3000 Leukozyten/ml nachweisbar (Ransohoff et al., 2003). T-Zellen (CD3-positiv) stellen mit 97% Durchschnittsanteil die deutliche Mehrheit der gefundenen Lymphozyten im CSF, während die Anzahl von B-Zellen und NK-Zellen sehr niedrig ist. CD4-positive Lymphozyten bilden mit 76% den größten Anteil an Lymphozyten im CSF, gefolgt CD8-positiven Lymphozyten mit 24% (Svenningsson et al., 1995). Im Vergleich mit dem peripheren Blut zeigt sich in Bezug auf CD4- und CD8-Lymphozyten eine Verschiebung zugunsten der CD4-Lymphozyten im CSF (CD4 im peripheren Blut 63% versus 37% CD8-Zellen).

Im CSF waren Gedächtniszellen in beiden T-Zell Subpopulationen verstärkt vorhanden, wohingegen im Vergleich mit den Blutproben keine erhöhte Konzentration von kürzlich aktivierten Zellen nachgewiesen werden konnte. (Svenningsson et al., 1995) Eine länger zurückliegende Aktivierung im Sinne von Gedächtniszellen scheint damit den Übertritt in den CSF selektiv zu fördern (Vrethem et al., 1998).

Im peripheren Blut haben B-Zellen mit 14% und CD56-positive Zellen mit ca. 18% deutlich mehr Gewicht als im CSF.

1.4.3. Aufenthalt der Lymphozyten im ZNS

Wie bereits erwähnt scheint die Antigenpezifität kein determinierender Faktor für den Eintritt der Lymphozyten ins ZNS zu sein – es findet also kein Homing statt. Vielmehr scheinen die aktivierten Lymphozyten unspezifisch durch das ZNS zu patrouillieren – auf der Suche nach ihrem Antigen.

Lymphozyten, die ihr spezifisches Antigen im ZNS nicht finden, verlassen es nach wenigen Tagen wieder. Lymphozyten hingegen, die mit Gehirnparenchym-Antigen reagieren, bleiben dort oder kehren später zurück (Hickey et al., 1991).

Das Mikromilieu im ZNS-Parenchym ist zum einen durch apoptotische und inhibitorische Mechanismen geprägt (FasL, B7-H1) und zum anderen durch Mechanismen von Astrozyten und Neuronen, die eine Umwandlung in regulatorische T-Zellen zur Folge haben (Trajkovic et al., 2004; Liu et al., 2006).

Astrozyten sezernieren unbekannte Substanzen, die die T-Zell Proliferation und Zytokin-Produktion inhibieren können (Meinl et al., 1994) oder die Umwandlung in regulatorische T-Zellen bewirken können (Trajkovic et al., 2004). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Neurone aktivierte T-Zellen unabhängig von ihrer Antigenpezifität in regulatorische T-Zellen umwandeln können (Liu et al., 2006).

Bei Entzündungen exprimieren Mikrogliazellen B7-H1 (ein Homolog des kostimulatorischen Moleküls B7) und vermindern T-Zell-Aktivierung (durch reduzierte Aktivität des T-Zell Aktivierungsmarkers ICOS) und Zytokin-Produktion (IL2 und Interferon γ) (Magnus et al., 2005).

Die Lymphozyten scheinen neben der Antigen suche noch weitere Funktionen zu haben: vor allem in aktiviertem Zustand bilden sie neurotrophische Faktoren und tragen zu Reparaturmechanismen im ZNS bei (Popovich et al., 2003). Einige T-Zellen akkumulierten im Hirngewebe und können Mikrogliazellen aktivieren (Cabarrocas et al., 2003).

Das Interleukin IL-15R α wird nur von CD8-positiven Lymphozyten ausgebildet und könnte das Überleben in Gegenwart von IL 15 produzierenden Zellen, wie Mikroglia und Astrozyten sichern (Bradl et al., 2005).

Erst kürzlich wurde beschrieben, dass CD4-positive T-Zellen, die in den entorhinalen Kortex injiziert worden waren, durch die kribriiforme Platte in die zervikalen Lymphknoten gewandert sind (Goldmann et al., 2006).

Einleitung

Die Anwesenheit von T-Lymphozyten in allen Organen und Geweben des Körpers, wenn auch in geringer Anzahl, ist eine wichtige Voraussetzung für die Integrität des Organismus (Bradl et al., 2005). Cabarrocas et al. beschrieben 2003, dass CD8-positive T-Zellen allein eine monophasische ZNS-Entzündung in immunkompetenten Tieren auslösen können, die durch T-Zellen und aktivierte Mikroglia dominiert wird, wohingegen hämatogene Makrophagen praktisch unbeteiligt sind. Die Entzündung ging mit einer spezifischen Zerstörung von Antigen enthaltenden Astrozyten einher ohne Myelin, Oligodendrozyten oder Neurone zu schädigen (Cabarrocas et al., 2003). McPherson et al. beschrieben dagegen 2006, dass bei der Immunabwehr von β -Galaktosidase exprimierenden Astrozyten durch aktivierte zytotoxische T-Zellen ein beachtlicher Schaden an umliegenden Neuronen entstanden war (McPherson et al., 2006).

1.4.4. Bisherige Daten über Lymphozyten im ZNS

Die wenigen vorhandenen Daten über Lymphozyten im ZNS sind oft an Tieren gewonnen. Aufgrund der geringen Dichte der Lymphozyten in gesunden Organismen konzentrierte sich zudem die Forschung auf die Rolle der T-Zellen bei EAE und anderen entzündlichen Erkrankungen (Bradl et al., 2005) oder bei Ischämie oder Trauma.

Unter dem Paradigma des Immunprivilegs beschrieb Hickey noch im Jahr 1987, dass im gesunden Gehirn faktisch keine Lymphozyten detektierbar sind (Hickey und Kimura, 1987), bzw. 1991 dass im gesunden ZNS von Nagetieren so geringe Zahlen an Lymphozyten enthalten sind, dass diese praktisch mit immunhistochemischen Methoden nicht detektierbar sind (Hickey et al., 1991).

Wenige Jahre später hatte sich gezeigt, dass Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke überschreiten können (Wekerle et al., 1991) und in geringer Anzahl im gesunden Rattengehirn zu finden sind ($< 0,1$ T-Lymphozyt pro mm^2 Rückenmark (5 μm dick)). Damals konzentrierte sich das Interesse auf CD4-positive T-Zellen, aber auch CD8-positive Zellen wurden gefunden (Hickey et al., 1991).

Einleitung

Anfangs konzentrierte sich die Forschung auf CD4-positive T-Zellen, die jahrzehntelang als die prädominanten Mediatoren der Multiplen Sklerose angesehen worden waren. Ein weiterer Grund mag auch gewesen sein, dass im Gegensatz zu den CD4-Zellen anfangs Antikörper gegen CD8-Moleküle in Formalin-fixiertem ZNS-Gewebe nicht leicht zu bekommen waren (Johnson et al., 2007).

Beim Vergleich verschiedener Organe bezüglich der Lymphozytenextravasation zeigte sich, dass in die meisten Körpergewebe nur relativ geringe Lymphozytenzahlen eindringen (Yeager et al., 2000). Dessen ungeachtet konnte eindeutig dargestellt werden, dass im Vergleich nach dem Gewicht (bei Ratten) ein geringerer Influx an Lymphozyten ins ZNS stattfindet als in andere Organe. Eine Differenzierung der Lymphozytentypen wurde nicht vorgenommen (Yeager et al., 2000). Auch Hickey konnte nach Injektion von markierten, aktivierten Lymphozyten eine geringere Gewebeskonzentration im Rückenmark (noch geringer im Gehirn) als in anderen Organen, im Blut und im Muskel zeigen (Hickey, 1999).

Phillips fand 1999 heraus, dass bei Ratten ein Gradient der Lymphozytendichte im ZNS entlang der Neuroachse entsteht (nach kaudalwärts zunehmende Anzahl). Er fand < 10 T-Zellen pro $9,2 \text{ mm}^2$ Hirngewebe ($6 \mu\text{m}$ dick) (\sim weniger als 1 T-Zelle pro mm^2) bei nicht behandelten Kontrolltieren. Nach Interferon (IFN) γ -Injektion konnte er vielfach höhere Zahlen von CD4-positiven Zellen im Hirnstamm als im Hippocampus detektieren und folgerte daraus, dass die Immunregulation ortsspezifisch unterschiedlich ist und eventuell von der lokalen Zytokin-Produktion abhängt. Nach Injektion waren im Parenchym fast ausschließlich CD4-positive Zellen vorhanden, während perivaskulär viermal mehr CD8-positive als CD4-positive Zellen gefunden wurden. Ein Unterschied zwischen grauer und weißer Substanz konnte nicht detektiert werden (Phillips und Lampson, 1999).

In der Arbeit von Bradl et al. (2005) über Lage und Anzahl von T-Zellen im intakten und neurodegenerativ veränderten Rückenmark der Ratte zeigte sich eine Übermacht der CD8-Lymphozyten gegenüber den CD4-Lymphozyten. T-Zellen waren vorwiegend in der grauen Substanz des Rückenmarks lokalisiert. Bei neuroaxonomer Degeneration oder Myelindegeneration zeigten sich erhöhte Lymphozytenzahlen sowie eine Ansammlung in den betroffenen Stellen, wobei diese Effekte deutlicher in der CD4-positiven Population auszumachen waren.

Einleitung

Möglicherweise deutet diese eindeutige Tendenz auf eine Komplementarität der beiden Lymphozytengruppen hin. Die Ergebnissen im Rattengewebe zeigten durchschnittlich weniger als 5 CD8-Lymphozyten pro Querschnitt (Bradl et al., 2005).

In der Kontrollgruppe einer ALS-Studie von Engelhardt (1993) wurden beispielsweise nur in einem von insgesamt elf Rückenmarksproben überhaupt Lymphozyten entdeckt (Engelhardt et al., 1993). Tomlinson et al. zeigten 1999, dass im Gehirn von Drogenabhängigen sowie in der gesunden Kontrollgruppe geringe Anzahlen von Lymphozyten dargestellt werden konnten, die hauptsächlich dem CD8-Typ angehörten und zudem den Aktivierungsmarker CD45RO exprimierten. CD4-Zellen wurden nur vereinzelt nachgewiesen (Tomlinson et al., 1999).

Im humanen erkrankten Hirngewebe konnte eine Dominanz von CD8-positiven Zellen in den T-Zell-Infiltraten gezeigt werden (Neumann et al., 2002), wohingegen in der zerebrospinalen Flüssigkeit (in Gesundheit) CD4-Lymphozyten Überhand haben (Svenningson et al., 1995).

Weitere Daten zu Lymphozyten im humanen ZNS stammen beispielsweise aus Schottland (Anthony et al., 2003). In dieser Arbeit wurden sehr niedrige B-Lymphozytenzahlen im normalen humanen Gehirn (in allen Teilen) vom aktivierten Typ (CD23-positiv) beschrieben. Die ungefähre Dichte von B-Lymphozyten im Hirngewebe betrug demnach zwischen 0 und 0,28 B-Zellen pro Quadratcentimeter an parenchymatösem Hirngewebe (5µm Dicke) (= 0,0028 B-Zellen pro mm²). Im perivaskulären Raum wurden keine B-Zellen gefunden. Außerdem wurden in dieser Arbeit und bereits davor geringe Mengen an T-Zellen beschrieben, die jedoch nie näher bestimmt worden waren (Anthony et al., 2003).

1.5. Ziele und Fragestellung dieser Arbeit

Diese Arbeit befasst sich mit der Frage, wie viele Lymphozyten und welche Subtypen in welchen Regionen des menschlichen Rückenmarks vorkommen, um eine Grundlage und Vergleichsmöglichkeit für ZNS-Erkrankungen zu schaffen. Wir wollen mit dieser Arbeit in der Diskussion über lymphozytäre Populationen und deren Bedeutung in Gesundheit und Krankheit den Fokus auf die Situation am Menschen richten.

Einleitung

Wie bereits erwähnt, existieren bereits einige Daten über Lymphozyten im ZNS von Tieren. Über Lymphozyten im menschlichen ZNS gibt es aber bis heute nur sehr wenige, zum Teil widersprüchliche Daten, so dass eine eindeutige Klärung notwendig scheint. Insbesondere die Situation im menschlichen Rückenmarksgewebe wurde bislang kaum untersucht. Zudem zeigte eine Untersuchung aus Wien (Bradl et al., 2005), bei der lymphozytäre Populationen im Rückenmark von Ratten untersucht wurden, überraschend hohe Zahlen an lymphozytären Zellen, weshalb sich diese Studie am menschlichen Rückenmark initiiert wurde.

Insbesondere im Rückenmark sind die Extravasationsprozesse und -wege der Leukozyten nur schlecht untersucht (Ransohoff et al., 2003; Man et al., 2007), weshalb in dieser Arbeit eine Untersuchung der lymphozytären Populationen am Rückenmarksgewebe durchgeführt wurde. Aufgrund der Homogenität bezüglich des anatomischen Aufbaus und der Anwesenheit der Blut-Hirn-Schranke, der beschriebenen höheren Anzahl von Lymphozyten und der eindeutigen Unterscheidbarkeit von grauer und weißer Substanz ergaben sich weiterhin einige Vorteile einer Untersuchung am Rückenmarksgewebe.

Die vorliegende Arbeit stellt eine Evaluation der Arbeit von Bradl et al. aus Wien (2005) am Menschen dar und versucht herauszufinden, in wieweit die bei der Ratte gefundenen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind.

Diese Arbeit bezieht sich auf Untersuchungen am humanen Rückenmark und beschäftigt sich mit Anzahl und Lokalisation der gefundenen Lymphozyten, Subtypisierung der Lymphozyten sowie inter- und intraindividuellen Unterschieden bezüglich Anzahl, Lage und Subtypisierung.

Wie viele Lymphozyten können in einem Querschnitt von 3,5 µm Dicke gefunden werden? Ist die Verteilung innerhalb des Gewebes homogen oder kann man bevorzugte Orte, eventuell sogar bevorzugte „Wanderwege“ oder Eintrittsstellen erkennen? Ist ein Gradient der Immunregulation entlang der Neuroachse erkennbar wie im Tierversuch beschrieben? Wie sind die Lymphozyten differenziert – ist der Phänotyp wirklich unmaßgeblich für den Eintritt und die Überlebenschance? Existieren Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen? Können die Unterschiede biologischen Gegebenheiten wie Alter, Geschlecht, Gesundheitszustand etc. zugeordnet werden?

2. Material und Methoden

2.1. Patientendaten

2.1.1. Allgemeines

Die hier unternommenen Untersuchungen beziehen sich auf immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von lymphozytären Subpopulationen im Rückenmark der Ratte (Bradl et al., 2005) und stellen eine Evaluation am menschlichen Gewebe dar.

Diese Arbeit fokussiert sich außerdem auf Rückenmarksgewebe, da aufgrund der Homogenität des anatomischen Aufbaus des Rückenmarks, der klaren Unterscheidbarkeit von grauer und weißer Substanz und der durchgängigen Anwesenheit der Blut-Hirn-Schranke eine bessere Vergleichbarkeit als am Cerebrum erzielt werden konnte. Zusätzlich waren in der Literatur im Rückenmark höhere Anzahlen von Lymphozyten beschrieben worden als im Gehirn (Bradl et al., 2005). Insbesondere im Rückenmark sind zudem die Extravasationsprozesse der Leukozyten nur schlecht untersucht (Man et al., 2007), was die Situation der lymphozytären Überwachung im Rückenmark umso interessanter macht.

Dessen ungeachtet kann diese immunhistochemische Studie nur einen Beitrag zum besseren Verständnis der Bedeutung und Funktion von Lymphozyten im ZNS-Gewebe darstellen und wird durch eine weitere Studie des Instituts für Hirnforschung Tübingen zur Situation am Cerebrum (unveröffentlichte Daten von Löffler, 2006) ergänzt.

Es wurden 15 menschliche Rückenmarke der Rückenmarks-Bank des Instituts für Hirnforschung in Tübingen untersucht. Die Rückenmarksbank beinhaltet unter anderem Rückenmarke von neun männlichen und sechs weiblichen Patienten, die im Alter von 19 bis 87 Jahren aufgrund verschiedener Ursachen verstarben (siehe Tabelle 1).

Bei vielfältigen stichprobenartigen Untersuchungen des Materials mit β -APP, Neurofilament, Tau, Ubiquitin und Ki67 konnten Alterationen durch traumatische, proliferative und neurodegenerative Ereignisse der untersuchten Rückenmarksregionen ausgeschlossen werden.

Leichte präterminale hypoxische Schädigungen wurden im Rahmen der im Verlauf des Todes eintretenden hypoxischen Ereignisse als natürlich auftretende Prozesse angesehen. Rückenmarksproben mit leichten hypoxischen Schädigungen wurden deshalb nicht von der Studie ausgeschlossen.

Untersuchungen am menschlichen Gewebe stellen den Forscher häufig vor große Probleme, da - anders als bei Tierversuchen - in der Regel keine vollständige Datenlage bezüglich Anamnese und Lebensbedingungen vorliegt. Bei Studien am menschlichen Gewebe muss außerdem oft eine gewisse Inhomogenität des Kollektivs akzeptiert werden, da bei ZNS-Gewebe (und insbesondere bei Rückenmarksgewebe) nur äußerst begrenzte Fallzahlen vorliegen.

Die Freilegung und Präparation des menschlichen Rückenmarks ist zudem aufwendig und störungsanfällig. Die in Tübingen existierende Rückenmarksbank ist unter anderem deshalb eine Seltenheit und bietet großes Potential für weitere Studien.

2.1.2. Klinische Daten

In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 1) sind die klinischen Daten aller untersuchten Patienten aufgeführt. Zusätzlich zu Alter (in Jahren), Geschlecht und neuropathologischer Beurteilung sind hier die Todesursache und wesentliche Allgemeinerkrankungen der Patienten ersichtlich.

Patienten mit einer entzündlichen Rückenmarkserkrankung wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Das Patientenkollektiv bestand aus sechs weiblichen und neun männlichen Patienten im Alter zwischen 19 und 87 Jahren. Das arithmetische Mittel des Alters im Kollektiv liegt bei 61,5 Jahren, der Median bei 67 Jahren.

Die Patienten wurden anhand der Todesursache und anhand von den bekannten Allgemein- und Nebenerkrankungen weiterhin in Gruppen bezüglich des Vorhandenseins einer malignen Neoplasie und/oder einer akut entzündlichen Konstellation eingeteilt (4 Malignompatienten, 7 Patienten mit entzündlichen Erkrankungen, davon 2 Patienten mit Überlappung) (siehe Tabelle 1: (M) = Malignom, (E) = Entzündung).

Diese Daten können aufgrund der lückenhaften Anamnesedaten nur als grobe Einteilungen verstanden werden, die eventuell erste Hinweise auf Korrelationen geben können. Leider lagen keine Daten bezüglich der Blut- oder Liquorwerte der Verstorbenen vor, so dass diesbezüglich keine Daten erhoben werden konnten.

Tabelle 1: Patientendaten mit Todesursache

Fall	Alter	Geschlecht	Neuropathologische Diagnosen	Todesursache	Nebenbefunde
ES 33/02	67	w	Amyotrophe Lateralsklerose	Pneumonie (E)	Myokarditis
ES 35/02	56	m	Hypoxie (Kleinhirn)	hämorrhagischer Schock, HIT II	GBS, Immunadsorption
ES 37/02	25	m	Hypoxie (Kleinhirn)	Emery-Dreifuß-Muskeldystrophie	
ES 77/02	38	m	Polygyrie	Cancer of unknown primary (M)	
ES 157/02	66	m	Hypoxie	Subarachnoidalblutung	
ES 172/02	67	m	Durchtrennung auf Höhe der Hirnschenkel/Brücke, Subarachnoidalblutung	Kopfschuss	frgl. Cortison/Morphinabusus
ES 195/02	19	m	Schädel-Hirn-Trauma, multiple ältere Einblutungen	Hirntrauma nach Autounfall	
ES 199/02	59	m	Hypoxie	Multiorganversagen, Pneumonie (E), Bronchialkarzinom (M)	Hypopharynxkarzinom (M)
ES 212/02	76	w	zerebr. Mikroangiopathie, evtl. Alzheimer	Herzversagen	unklares Fieber (E), KHK
ES 11/03	67	m	Hypoxie, lymphozyt. perivaskuläre Infiltrate	Herzversagen, Pneumonie (E)	Adenokarzinom (M)
ES 18/03	78	w	Hypoxie, epileptische Krampfanfälle	Pneumonie (E)	
ES 30/03	69	w	Hypoxie	septischer Schock(E), Herzversagen	Diabetes, Herzinfarkt
ES 31/03	77	w	ohne pathologischen Befund	septischer Schock (E)	Schluckstörungen
ES 51/03	87	w	zerebraler Apoplex	unklar	Infektion, CUP (M)
Es 97/03	71	m	ohne pathologischen Befund	kardiogener Schock	

2.2. Gewebeproben

Das Rückenmark bietet als Ort der Untersuchung verschiedene Vorteile: es stellt ein sehr homogenes Gewebe dar und wird von einer einheitlich dichten Blut-Hirn-Schranke umgeben. Dadurch ist es gut geeignet, grundlegende Tendenzen sichtbar zu machen, da es nur wenige Einflussgrößen gibt, die das Bild verzerren könnten.

Um einen guten Überblick über die Verteilung und Dichte der Lymphozyten im gesamten menschlichen Rückenmark zu bekommen, wurden verschiedene Regionen des Rückenmarks untersucht und miteinander verglichen.

Es wurden exemplarisch aus jedem Rückenmarksabschnitt (zervikal, thorakal, lumbal, sakral) mehrere Querschnitte untersucht, um die Verteilung entlang der Neuroachse beurteilen zu können. Jeder Rückenmarksquerschnitt wurde in seiner Gesamtheit untersucht. Hierbei wurde der Querschnitt den physiologischen Leitungsbahnen entsprechend in sechs Regionen geteilt (Abbildung 5): Vorderhorn, Hinterhorn, Zentralkanal in der grauen Substanz; Vordersäule, Hintersäule, Seitensäule in der weißen Substanz.

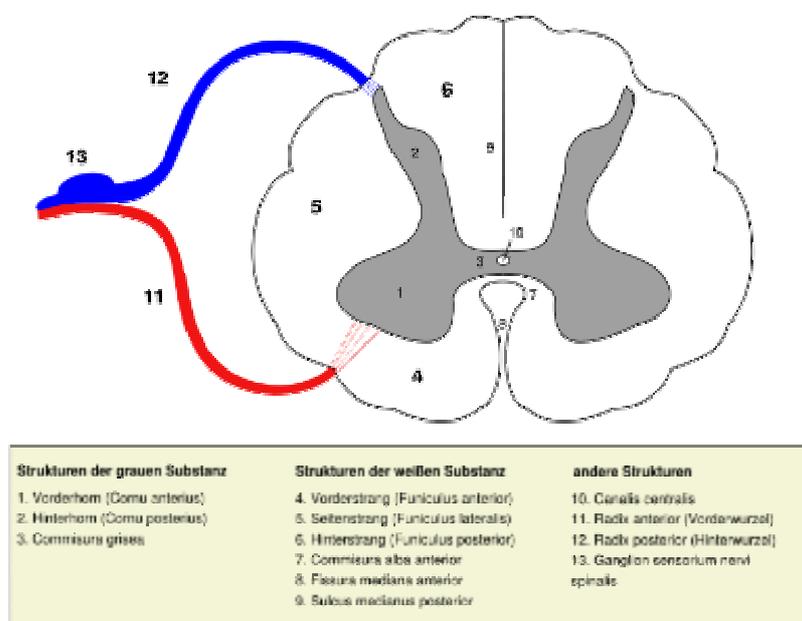


Abbildung 5: Querschnitt des menschlichen Rückenmarks mit Leitungsbahnen (akademisches Lexikon)

Für die beiden Antikörper CD3 und CD8 wurden von jeder der vier Höhen bei jedem Patienten mindestens vier Querschnitte untersucht, um ein möglichst genaues Bild über die Verteilung und die Anzahl der Lymphozyten zu bekommen. Bei den Untersuchungen mit den Antikörpern CD20 und CD57 ergaben sich nur sehr geringe Zellzahlen mit minimalen Abweichungen, so dass pro Höhe pro Patient nur je ein Querschnitt untersucht wurde.

2.3. Herstellung der histologischen Präparate

Die Rückenmarke wurden mit 4%-igem Formalin, in phosphatgepufferter Kochsalzlösung fixiert (pH 7,4). Die entnommenen Proben wurden nach Fixierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 70%, 80%, 96%), zweimal in einem Gemisch aus 100%-igem Ethanol und Chloroform sowie zweimal in unverdünntem Chloroform entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden von den Paraffinblöcken an einem Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) ca. 3,5 µm dicke Schnitte gefertigt und auf Silanbeschichtete Objektträger aufgezogen.

Zur Vorbereitung der Schnitte für immunhistochemische Methoden erfolgte die Entparaffinierung in Chloroform (3 x 10 min.) und danach eine Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 100%, 96%, 70 %, destilliertes Wasser, jeweils 2 min.).

2.4. Immunhistochemie

2.4.1 Antikörper zur Darstellung von Lymphozyten

Die verwendeten Antikörper waren jeweils gegen die nachfolgend aufgeführten Antigene gerichtet. Die immunhistochemischen Färbungen für die jeweiligen Antikörper wurden für alle oben erwähnten Präparate aller Patienten durchgeführt. Es wurden ausschließlich monoklonale Primärantikörper verwendet.

Auf eine Färbung mit dem CD4-Antikörper gegen das CD4-Antigen auf T-Helferzellpopulationen, bzw. auf Mikroglia, Makrophagen und perivaskulären Zellen, (Perry und Gordon, 1987) wurde in dieser Arbeit verzichtet, da bereits in der Arbeit von Stoll et al. (2006) eine Untersuchung diesbezüglich stattgefunden hatte, die nicht nur eine nahezu vollständig fehlende CD4-Expression auf Mikroglia zeigte, sondern auch eine insgesamt sehr niedrige Expressionsquote im gesamten Rückenmarksgewebe darlegte (unveröffentlichte Daten).

CD3

CD3 ist ein Antigen, das auf allen reifen T-Zellen und Thymozyten exprimiert wird (Reinherz und Schlossmann, 1980). Es dient im Gewebe als Gesamt-T-Zell-Marker. CD3 Proteine werden benötigt, um die $\alpha\beta$ -Heterodimere des T-Zellrezeptors (TCR) an der Oberfläche zu exprimieren und über den Rezeptor Signale nach intrazellulär zu vermitteln.

Sie besitzen in ihren zytoplasmatischen Enden eine extrazelluläre immunglobulinartige Domäne sowie eine einzelne ITAM (Tyrosinaktivierungssequenzen von Immunrezeptoren) zur Signaltransduktion nach erfolgter Bindung zwischen Rezeptor und Antigen (Tsoukas et al., 1985; Law et al., 2002). In ihren Transmembrandomänen haben sie saure negativ geladene Reste, die mit den positiven Ladungen der $\alpha\beta$ Ketten wechselwirken können (Janeway et al., 2005, S.214).

Verwendet wurde ein CD3-Antikörper der Firma Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK, Klon PS1.

CD8

CD8 ist ein Oberflächenantigen, welches sich auf zytotoxischen T-Zellen, T-Gedächtniszellen, Thymozyten (Masopust et al., 2004) und zum Teil auf regulatorischen T-Lymphozyten (Jiang und Chess, 2004) und NK-Zellen (Foster et al., 1996) findet. Es wurde vereinzelt auch auf Mikrogliazellen beschrieben (Schroeter et al., 2003).

Die Funktion des CD8-Moleküls besteht in der Mitwirkung bei der Antigenpräsentation, es fungiert als Ko-Rezeptor für MHC-Klasse-I- Moleküle und reguliert die Aktivität des CD3/TCR – Komplexes (Barber et al., 1989). Durch eine erfolgreiche Bindung wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst, die die Aktivierung der T-Zelle, bzw. – im Fall einer unreifen T-Zelle im Thymus – die Vermittlung essentieller Überlebenssignale zur Folge hat. CD8 wurde vielmehr sogar eine aktive Rolle nicht nur in der Signaltransduktion, sondern auch in der eigentlichen zellulären Bindung zwischen T-Zelle und APC nachgewiesen (Daniels und Jameson, 2000).

Das CD8-Molekül ist ein durch eine Disulfidbrücke verbundenes Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette. CD8 bindet Lck an der zytoplasmatischen Seite der Membran. Es besitzt zwei Untereinheiten und liegt in einer hetero- oder homodimeren Form vor (Zamoyska, 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein CD8-Antikörper der Firma DakoCytomation, Glostrup, Dänemark (Klon: C8/144B) verwendet.

CD20

CD20 ist ein Oberflächenantigen, das von B-Zell-Vorläufern und reifen B-Lymphozyten exprimiert wird, nicht aber von Plasmazellen (Nadler et al., 1984). Oligodimere von CD20 bilden möglicherweise einen Kalziumkanal und spielen dadurch eine Rolle bei der Regulation des transmembranösen konduktiven Ca^{2+} -Flusses in die B-Zellen. Dadurch ist es möglicherweise an der Regulation der B-Zell-Proliferation und - Differenzierung beteiligt (Tedder und Engel, 1994). Der in dieser Arbeit benutzte CD20-Antikörper wurde von der Firma DakoCytomation, Glostrup, Dänemark hergestellt (Klon: L26).

CD57

Das CD57-Oberflächenantigen ist assoziiert mit dem myeloid assoziierten Glykoprotein (MAG) und findet sich unter anderem auf mononuklearen Zellen mit natürlicher Killerzell-Aktivität (Tarazona et al., 2000) sowie auf neuroektodermalen Zellen.

CD57 ist ein sulfatierter Kohlenhydratrest auf einem Glykoprotein auf neuronalen Zellen (Kruse et al., 1984). CD57 wird auf einer Subpopulation von ca. 15-20% peripherer mononukleärer Blutzellen exprimiert und findet sich auf ca. 60% der aktiven NK-Zellen sowie auf einem geringen Teil von T-Zellen (Ohkawa et al., 2001). Der Großteil dieser Zellen, die CD57 und CD8 ko-exprimieren, gehört den zytotoxischen/suppressorischen T-Zellen an.

NK-Zellen gehören in der Regel dem CD3-negativem und CD8-negativem Zelltypus an, obwohl auch schon CD8-positive, CD3-negative, CD56-positive NK-Zellen beschrieben worden sind.

Da eine Färbung mit dem spezifischeren CD56 zu einer starken Hintergrundfärbung im ZNS-Gewebe führte, wurde in dieser Arbeit an neuralem Gewebe auf den Marker CD57 ausgewichen.

Verwendet wurde der CD57-Antikörper der Firma Novocastra, Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK (Klon: NK-1).

Granzym B

Granzyme stellen eine Reihe von zytolytischen Enzymen, genauer Serine-Esterasen, dar, die zelluläre Apoptose auslösen können und mit deren Hilfe CD8-positive zytotoxische T-Zellen (Killerzellen) Virus befallene Zellen abtöten (Bratke et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit soll der Einsatz dieses Antikörpers der weiteren Charakterisierung der gefundenen CD8-positiven Lymphozyten dienen.

Der Antikörper entstammte dem Klon GB7 (ab11198) der Firma Abcam Ltd., Cambridge, UK.

Ergebnisse

Perforin

Perforin ist eines der wichtigsten zytolytischen Proteine und wird durch zytotoxische Effektor-T-Lymphozyten oder NK-Zellen freigesetzt. Menschliches Perforin ist ein Protein aus 555 Aminosäuren, das Phosphorylcholin auf Zielzellmembranen bindet und mittels einer transmembranösen Kanalbildung Poren induziert. Durch den hydrophilen Kanal mit einem Durchmesser von 16nm dringen Wasser und Salze in die Zielzellen und zerstören sie (Janeway et al., 2005).

Der verwendete Antikörper der Firma Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK entsprach dem Klon 5B10.

CD25

Der CD25-Antikörper bindet an der α -Kette des IL-2-Rezeptors. Diese α -Kette des IL-2-Rezeptors bildet zusammen mit der β -Kette (CD122) und der γ -Kette (CD132) den funktionalen IL-2-Rezeptor Komplex. Die α -Kette des IL-2-Rezeptors wird auf CD4-positiven Treg, auf aktivierten T und B Zellen sowie in geringerem Maße auf aktivierten dendritischen Zellen exprimiert.

Verwendet wurde der Klon 4C9 der Firma Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK.

Foxp3

Foxp3 ist ein Mitglied der forkhead/winged-helix Familie der transkriptionellen Regulatoren und ist essential zur Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts.

FOXP3 wird stark auf CD25- und CD4-positiven regulatorischen T Zellen exprimiert sowie schwach auf CD4-positiven/CD25-negativen T-Zellen, wohingegen es in CD4-negativen/CD8-positiven Zellen nur in geringem Ausmaß und unter bestimmten Konditionen nachgewiesen werden konnte (Kapp und Bucy, 2008).

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein Produkt der Firma Abcam Ltd., Cambridge, UK vom Klon ab10563 verwendet.

2.4.2. Antikörper zur Darstellung von Mikroglia

Zum Ausschluss einer unselektiven Anfärbung von Zellen mit dem CD8-Antikörper wurden morphologischen Kriterien während der visuellen Auszählung hinzugezogen. Zusätzlich wurden stichprobenartige Doppelfärbungen mit einem Zweitantikörper gegen CD 68 zur Detektion von CD8-positiven Mikrogliazellen durchgeführt.

CD68 ist ein Transmembranprotein, das hauptsächlich in Lysosomen lokalisiert ist. Regulär wird es von Monozyten, Makrophagen und Mikroglia exprimiert. CD68 konnte aber auch schon auf dendritischen Zellen, Granulozyten, B- und T-Zellen sowie NK-Zellen detektiert werden (Ulvestad et al., 1994). Verwendet wurde in der vorliegenden Arbeit der CD68-Klon KP1 der Firma Dako.

2.4.3. Vorbehandlung und immunhistochemische Färbung

Für alle immunhistochemischen Färbungen war eine Vorbehandlung zur Freilegung der Antigene notwendig. Diese erfolgte über 15 Minuten in Zitratpuffer (pH 6,0) in einem Mikrowellenofen bei 750 Watt. Die endogene Peroxidase wurde mit 1% H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) in 100% Methanol geblockt (15 Min.). Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Gewebe für 15 Minuten mit 1:10 in TRIS-gepufferter Salzlösung verdünntem versetztem Standardschweineserum inkubiert. Danach folgte eine Inkubation (1 Stunde) mit den in TBS-Lösung verdünnten Primärantikörpern (Verdünnungen in Tabelle 2). Nach dem Spülen mit TBS-Lösung inkubierten die Gewebe für 30 Minuten mit biotinilierten anti-Maus F(ab')₂-Brückenantikörper (Firma: Dako). Nach einem Spülgang wurden die Gewebe mit dem Peroxidasegekoppelten Avidin-Biotin-Komplex (ABC) der Firma Dako für 30 Minuten inkubiert und nach einem weiteren Spülgang mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) der Firma Sigma in Deisenhofen als Chromogen die spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen sichtbar gemacht (Hsu et al., 1981). Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurden alle Schnitte (bis auf vereinzelte Ausnahmen) mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Ergebnisse

Zur Dehydrierung durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe sowie 3 mal 10 Minuten Xylol und wurden anschließend mit einem Deckglas versehen. Die Sensitivität der Methode wurde durch Positivkontrollen (Lymphknoten) überprüft. Bei Negativkontrollen ersetzte eine Pufferlösung den primären Antikörper, sodass eine unspezifische Bindung ausgeschlossen werden konnte.

Tabelle 2: Verdünnung, Spezifität, Vorbehandlung und Funktion

Antikörper gegen	Verdünnung	Spezifität	Vorbehandlung	Funktion
CD3	1:100	Monoklonal	Mikrowelle	Gesamt T-Zell-Marker
CD8	1:50	Monoklonal	Mikrowelle	zytotoxische/ suppressorische T-Zellen
CD20	1:100	Monoklonal	Mikrowelle	B-Zellen
CD57	1:50	Monoklonal	Mikrowelle	Nk-Zellen
CD68	1:10	Monoklonal	Mikrowelle	Monozyten, Mikroglia
Granzym B	1:100	Monoklonal	Mikrowelle	zytotoxische Zellen
Perforin	1:50	Monoklonal	Mikrowelle	zytotoxische Zellen
CD25	1:200	Monoklonal	Mikrowelle	regulatorische Zellen
FoxP3	1:20	Monoklonal	Mikrowelle	regulatorische Zellen

2.4.4. Doppelfärbungen zur Überprüfung der Selektivität

Zur Kontrolle der selektiven Anfärbung von Lymphozyten wurde die ABC-Methode mit dem AP-Komplex (Alkalische Phosphatase) der Firma Dako kombiniert und auf diese Weise exemplarische Doppelfärbungen durchgeführt. Nach der ABC-Färbung fand erneut die Vorbehandlung statt, ohne jedoch anschließend das Blockieren der endogenen Peroxidase zu wiederholen. Nach Inkubation mit Schweineserum und Auftragen des zweiten monoklonalen Primärantikörpers, folgte noch einmal die Inkubation mit Anti-Maus IgG(ab')₂ Fragmenten und schließlich mit dem AP-Komplex.

Als Chromogen diente Fast Blue Salz (Firma Sigma, Deisenhofen). Bei den Doppelfärbungen wurde nicht mit Hämatoxylin gegengefärbt, um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten.

2.5. Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung

Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland und Polyvar, Reichert-Jung, Bensheim, Deutschland). Für die statistische Auswertung wurden bei der jeweiligen Antigenfärbung alle braun markierten Zellen mit deutlich sichtbarem Zellkern und mit typischer Lymphozytenmorphologie gezählt. Da relativ zu der Gesamtzahl aller vorhandenen Zellen eine geringe Anzahl an Lymphozyten erwartet und gefunden wurde, wurde der Querschnitt im Gesamten ausgewertet und keine prozentuale oder flächenbezogene Zählung durchgeführt. Bei unregelmäßiger Ausbreitung der Lymphozyten im Gewebe hätte eine partielle Auszählung zu großer Ungenauigkeit geführt.

Die Lymphozyten wurden entsprechend ihrer Lage als parenchymatöse oder perivaskuläre Zellen eingeteilt. Positiv markierte Zellen in den Blutgefäßen berücksichtigte die Auswertung nicht, ebenso wenig positiv gefärbte Strukturen, denen nicht eindeutig einem Zellkern zugeordnet werden konnte oder Zellen, die außerhalb des Rückenmarks lagen.

Parenchymatöse Zellen wurden als allseits von Hirnparenchym umgebene Zellen definiert. Alle Lymphozyten in der unmittelbaren Nähe von Gefäßen und außerhalb des Gefäßendothels, die nicht zu den parenchymatösen Zellen gehören, wurden als perivaskuläre Lymphozyten gewertet.

Alle in dieser Arbeit gezeigten Photographien stammen von Diafilm-Farbabzügen (Kodak, EPY64T, München, Deutschland), die zum größten Teil mittels Normarski-Technik aufgenommen wurden (Olympus).

2.6. Statistische Methoden

Die Menge immunreaktiver Zellen pro Rückenmarksquerschnitt wurde aufgrund einer fehlenden Normalverteilung der Daten für die weiteren parametrischen statistischen Untersuchungen mit Hilfe des dekadischen Logarithmus transformiert. Hierzu wurde zu allen Anteilen 0,1 addiert, da bei der Auswertung auch 0-Werte als Ergebnis vorkamen. Wurden für Antikörper mehrere Querschnitte auf einer Rückenmarkshöhe ausgewertet, so wurde zuerst der Mittelwert der Querschnitte gebildet und dieser anschließend transformiert und für die weitere statistische Analyse benutzt. Vergleiche hinsichtlich der Expression verschiedener Moleküle innerhalb eines definierten Kompartimentes bzw. einer Region erfolgte über einen Mittelwertvergleich der transformierten Daten mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und einem post-hoc Test mittels Tukey-Kramer HSD Verfahren. Die Vergleiche von Sepsis, Malignomerkrankung und Geschlecht nach getrennten Gruppen wurden mit Hilfe des T-Tests analysiert. Für die Untersuchung der Einflussgröße Alter wurde eine Korrelationsanalyse für die jeweiligen Antikörper mit dem Alter durchgeführt. Für signifikante Einflussgrößen (hier Alter) wurde abschließend noch eine multifaktorielle Analyse durchgeführt. Insgesamt wurde für alle Untersuchungen eine Signifikanzschwelle von 5% gewählt. Für alle statistischen Berechnungen wurden die Programme Excel und JMP IN (www.jmp.com) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Vorwort

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit bestätigen einige bereits angenommene oder bekannte Tatsachen der Immunologie des ZNS, wie beispielsweise die Anwesenheit von einer vergleichsweise geringen Anzahl an Lymphozyten im Rückenmarksgewebe. In einigen Details (zum Beispiel der Subtypisierung) wurden jedoch überraschende Ergebnisse erzielt, die teilweise auch nicht den Ergebnissen der Rückenmarksuntersuchung am Rattengewebe entsprechen.

Diese Arbeit hat grundlegende Daten über Anzahl, Lage und Subtypisierung von Lymphozyten im menschlichen Rückenmark erbracht. Es wurde

- der Einfluss der Höhe des Rückenmarks-Querschnitts auf die Lymphozytenpopulation im menschlichen Rückenmark, untersucht.
- die Lage der Lymphozyten im Gewebe bezüglich der Gefäßversorgung und der Nervenleitungsbahnen analysiert.
- die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation bezüglich Subtypen untersucht.
- die jeweiligen Ergebnisse mit den Patientendaten korreliert, um Zusammenhänge zwischen Anzahl, Zusammensetzung und Lage der Lymphozyten und den epidemiologischen Daten der Patienten wie beispielsweise Geschlecht oder Alter erkennen zu können.

Um die untenstehenden Abbildungen besser verständlich zu machen, sollen an dieser Stelle einige Ausdrücke spezifisch für diese Arbeit definiert werden.

Rückenmarks-Querschnitt = graue +weiße Substanz

Ein (Rückenmarks-) Querschnitt soll im Folgenden als ein 3,5 µm dicker Querschnitt durch das menschliche Rückenmark definiert sein und beinhaltet die Summe der jeweiligen Lymphozyten in der grauen und weißen Substanz, wobei sich die weiße Substanz aus Vordersäule, Seitensäule und Hintersäule

Ergebnisse

zusammensetzt und die graue Substanz aus Vorderhorn, Hinterhorn und Umgebung um den Zentralkanal (siehe Abbildung 5).

Graue Substanz = Hinterhornregion + Vorderhornregion + Zentralkanalregion

Weißer Substanz = Vordersäule + Hintersäule + Seitensäule

Gesamtzahl an Lymphozyten = parenchymal + perivaskulär

Wenn im Folgenden von der Gesamtzahl an Lymphozyten gesprochen wird, so bezieht sich das auf die Summe aus parenchymal und perivaskulär gelegenen Lymphozyten pro Rückenmarksquerschnitt.

(Totale) Lymphozytenanzahl

Wie bereits beschrieben stellt die CD4-Population der T-Lymphozyten im menschlichen Rückenmark einen äußerst geringen, kaum nachweisbaren Faktor da. Die Ergebnisse der CD3-Färbung und CD8-Färbung erbrachten keine signifikanten Unterschiede. Um jedoch auch die CD8-positiven CD3-negativen Zellen einzubeziehen, wurde hier für die Abschätzung der Lymphozytengesamtzahl die Summe aus CD8-positiven, CD20-positiven und CD57-positiven Lymphozyten gewählt, wobei eine Ko-Expression von CD8 und CD57 nicht restlos ausgeschlossen werden kann, jedoch aufgrund der minimalen Anzahl von CD57-positiven Zellen vernachlässigbar erscheint.

Die kleine Gruppe der in der Doppelfärbung vereinzelt nachgewiesenen CD3-positiven CD8-negativen Zellen konnte somit rechnerisch nicht erfasst werden.

Einzelpräparat

Diese Arbeit hat die lymphozytäre Population im menschlichen Rückenmark anhand verschiedener Parameter beleuchtet. Einzelpräparate repräsentieren die Grundlage für die Rohdaten und beziehen sich auf einen einzelnen Rückenmarksquerschnitt.

Für CD8 und CD3 wurden pro Rückenmarkshöhe mehrere Einzelpräparate ausgewertet, die später zusammengefasst wurden (arithmetisches Mittel).

3.2. Grundlegende Ergebnisse

Durchschnittlich wurden ca. 97 CD8-positive, ca. 3 CD20-positive und 0,25 CD57-positive Lymphozyten pro Rückenmarksquerschnitt gefunden, wodurch sich eine Summe von ca. 100 Lymphozyten pro Rückenmarksquerschnitt ergibt. Die Lymphozyten zeigten allesamt die typische Morphologie von lymphozytären Zellen mit kondensiertem Chromatin im Nukleus und schmalen Zytoplasmasaum (Abbildung 6).

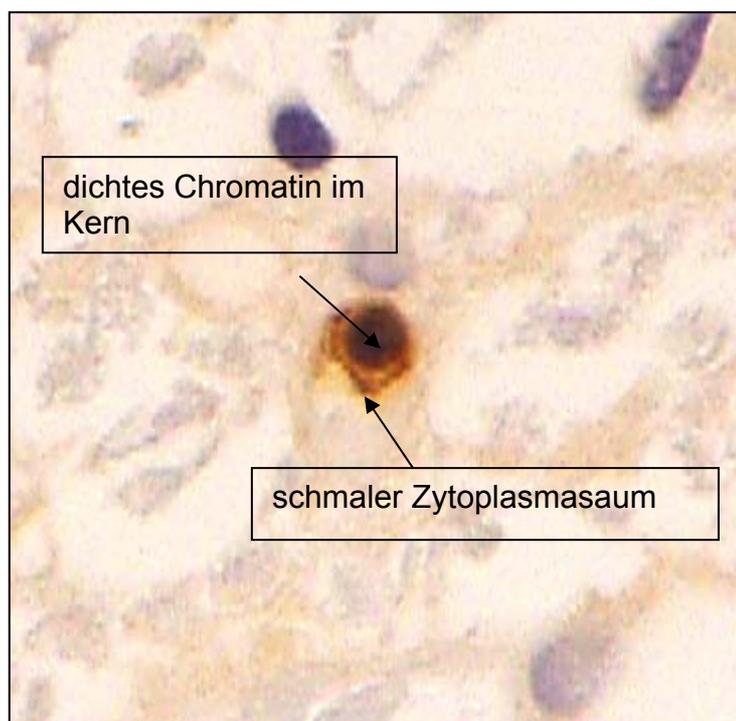


Abbildung 6: CD8-Lymphozyt mit typischer Morphologie

Die Verteilung der einzelnen Werte streute stark und wies vor allem starke Ausreißer nach oben auf, wodurch sich der niedrigere Median von 80,9 Lymphozyten pro Rückenmarksquerschnitt erklärt.

Das Rückenmark mit der durchschnittlich niedrigsten Lymphozytenanzahl (ES 195/02) wies 10,44 Lymphozyten pro Querschnitt auf, während das Rückenmark mit der höchsten Anzahl (ES 212/02) durchschnittlich 274 Lymphozyten pro Querschnitt zeigte (Abbildung 7).

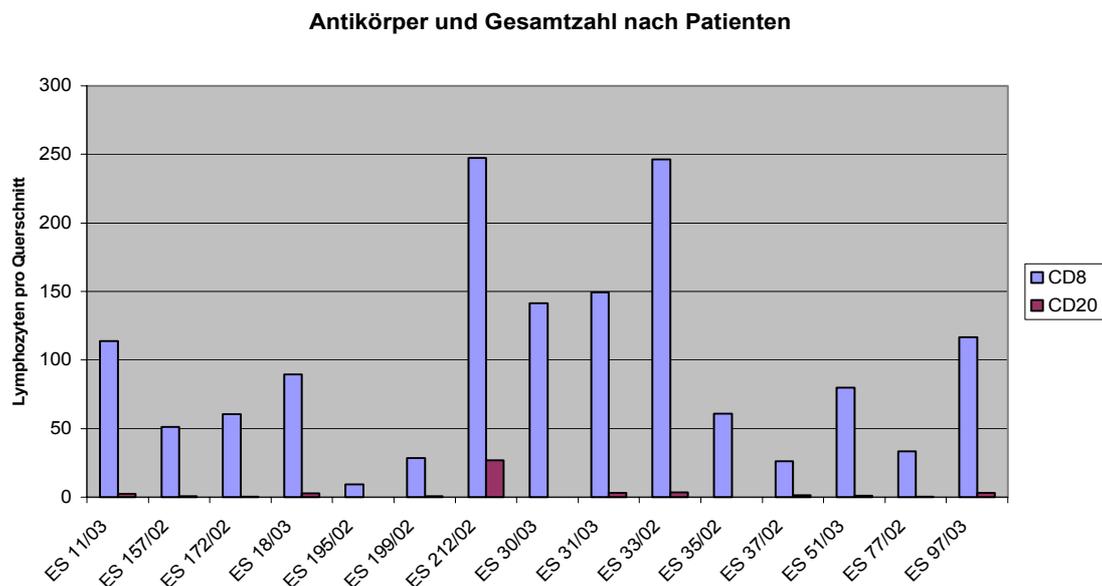


Abbildung 7: Mittelwerte der Gesamtzahl der Lymphozyten pro Querschnitt

3.3. Antikörpersubtypen

Beim Vergleich der vier untersuchten Antikörpertypen (siehe Abbildung 8) fiel eine deutliche und signifikante Dominanz der CD8-positiven Lymphozyten gegenüber den Populationen der CD20- und CD57-positiven Lymphozyten auf: Ungefähr 97% der gefundenen Lymphozyten waren vom CD8-positiven Typ (siehe Abbildung 8).

Die folgenden drei Abbildungen mit den dazugehörigen Tabellen zeigen in der Abbildung jeweils die Verteilung der absoluten Lymphozytenzahlen (alle nicht intravasal gelegenen Lymphozyten des jeweiligen Antikörpertyps in einem Querschnitt, die in der zweiten und dritten Abbildung getrennt nach parenchymatösen und perivaskulären Lymphozyten dargestellt werden). Die Ergebnisse der statistischen Berechnungen sind in den Tabellen unter der jeweiligen Abbildung dargestellt. Das Sternchen (*) drückt einen signifikanten Unterschied aus.

Ergebnisse

An erster Stelle folgt nun die Darstellung der parenchymal und perivaskulär gelegenen Lymphozyten anhand ihrer Lymphozyten-Subtyp-Zugehörigkeit (Abbildung 8) sowie die dazugehörigen Berechnungen.

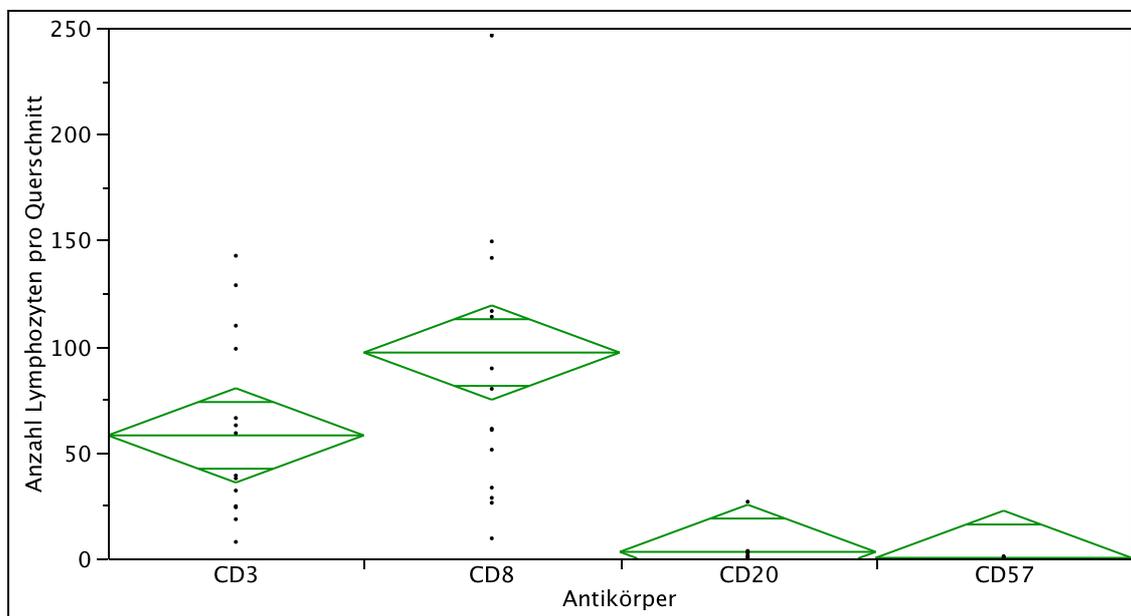


Abbildung 8: Mittelwerte und 95% Konfidenzintervall der parenchymal und perivaskulär gelegenen Lymphozyten

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der parenchymal und perivaskulär gelegenen Lymphozyten

Stufe	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
CD3	57,9319	43,0716	11,121	34,08	81,78
CD8	96,9629	74,0596	19,122	55,95	137,98
CD20	3,0511	6,6550	1,718	-0,63	6,74
CD57	0,2444	0,3325	0,086	0,06029	0,43

Testung der verschiedenen Marker auf signifikante Unterschiede

Kategorie	- Kategorie	p-Wert
CD8	CD57	<,0001*
CD3	CD57	<,0001*
CD8	CD20	<,0001*
CD3	CD20	<,0001*
CD20	CD57	0,0030*
CD8	CD3	0,6256

Ergebnisse

Die gemittelte CD3-Population, die sich nicht signifikant von der CD8-Population unterschied, war mit einem Durchschnittswert von ca. 58 Lymphozyten/Querschnitt in den untersuchten Rückenmarken ebenfalls signifikant größer als die CD20- und CD57-Populationen.

CD20-positive Lymphozyten traten signifikant häufiger als die CD57-positiven Zellen auf. Durchschnittlich ließen sich ungefähr 3 CD20-Lymphozyten pro Rückenmarksquerschnitt detektieren.

Im Folgenden wird hier die Differenzierung nach parenchymatös und perivaskulär gelegenen Lymphozyten vorgenommen (Abbildung 9, Abbildung 10).

Die Betrachtung der parenchymalen Lymphozyten zeigt signifikante Unterschiede in der Anzahl der CD8, bzw. CD3 Lymphozyten (die sich untereinander nicht signifikant unterscheiden) zur CD20- und CD57-Population. Auch die in geringerer Anzahl vorhandenen CD20- und CD57-Populationen zeigen einen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 9).

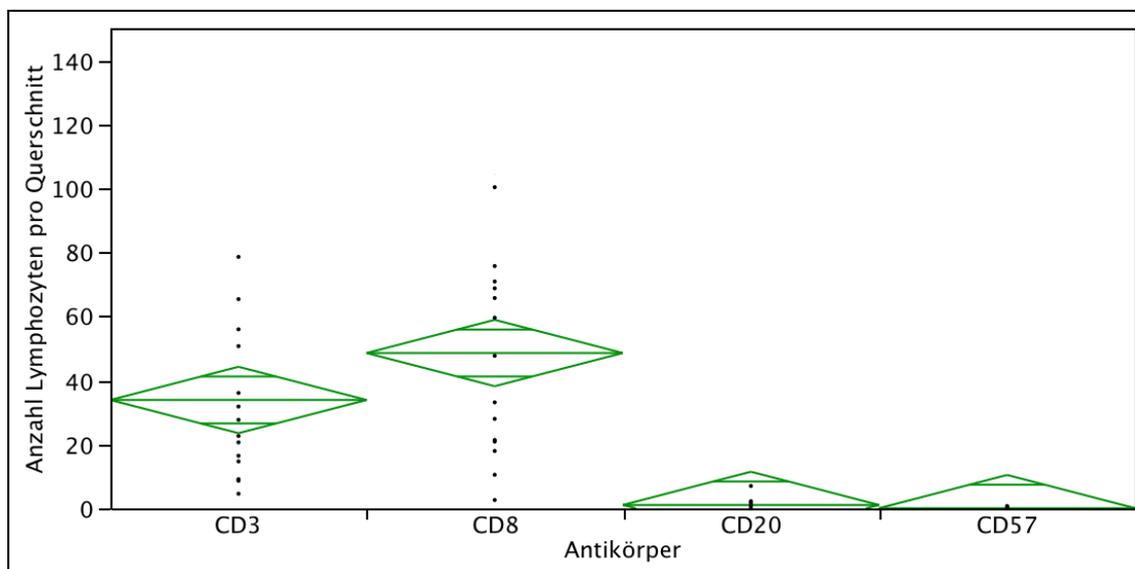


Abbildung 9: Mittelwerte der parenchymatös gelegenen Lymphozyten mit 95% Konfidenzintervall

Ergebnisse

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der parenchymal gelegenen Lymphozyten

Stufe	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
CD3	33,8653	23,7072	6,1212	20,74	46,994
CD8	48,5383	32,2875	8,3366	30,66	66,419
CD20	1,0800	1,8175	0,4693	0,07353	2,086
CD57	0,0722	0,2062	0,0532	-0,042	0,186

Testung der verschiedenen Marker auf signifikante Unterschiede

Kategorie	- Kategorie	p-Wert
CD8	CD57	<,0001*
CD3	CD57	<,0001*
CD8	CD20	<,0001*
CD3	CD20	<,0001*
CD20	CD57	0,0069*
CD8	CD3	0,8314

Auch die Betrachtung der perivaskulär gelegenen Lymphozyten zeigt eine ähnliche Verteilung. In der statistischen Berechnung zeigte sich hier jedoch im Gegensatz zur Betrachtung der parenchymalen Lymphozyten kein signifikanter Unterschied zwischen CD20- und CD57-Zellen.

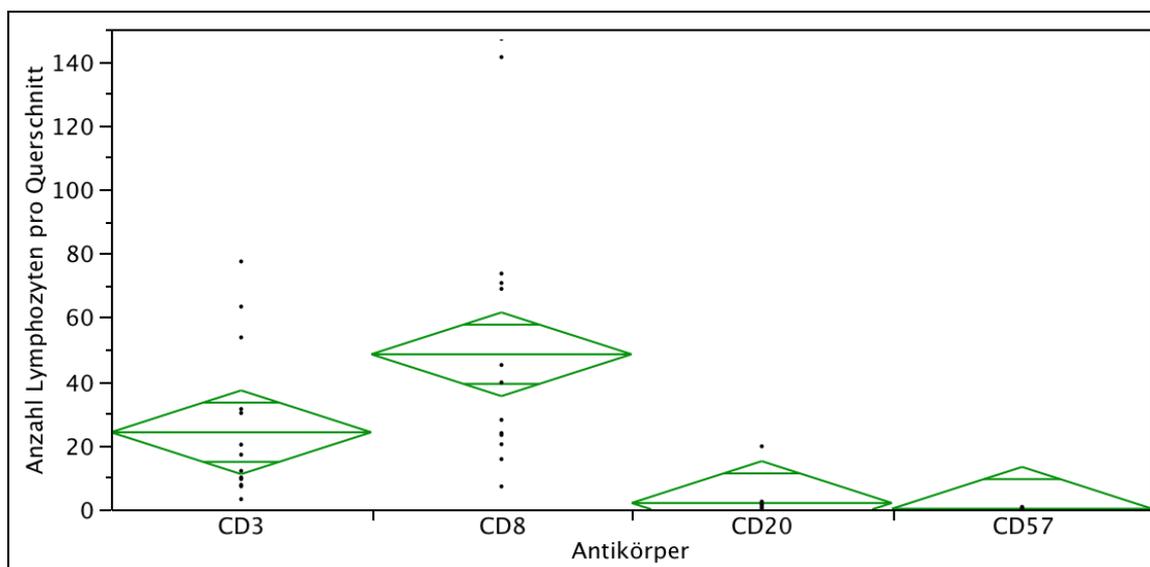


Abbildung 10: Mittelwerte und 95% Konfidenzintervall der perivaskulären Lymphozyten

Tabelle 5: Mittelwerte und Std.-Abweichungen der perivaskulären Lymphozyten

Stufe	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
CD3	24,0667	22,9964	5,938	11,33	36,802
CD8	48,4245	44,7417	11,552	23,65	73,202
CD20	1,9711	4,9514	1,278	-0,77	4,713
CD57	0,1722	0,2281	0,059	0,04588	0,299

Testung der verschiedenen Marker auf signifikante Unterschiede

Kategorie	- Kategorie	p-Wert
CD8	CD57	<,0001*
CD3	CD57	<,0001*
CD8	CD20	<,0001*
CD3	CD20	<,0001*
CD20	CD57	0,0511
CD8	CD3	0,3181

CD57-positive Lymphozyten traten nur vereinzelt auf und erreichten Durchschnittswerte pro Rückenmarksquerschnitt von unter eins (ca. 0,25 CD57-positive Lymphozyten/Querschnitt), weshalb die Bande der CD57-positiven Lymphozyten in den Abbildungen häufig kaum ersichtlich ist und im Verlauf zum Teil nicht mehr dargestellt wird.

Zur weiteren Subtypisierung der dominanten CD8-Population wurden außerdem exemplarische Färbungen mit Granzym B und Perforin durchgeführt, die keinen Nachweis von Granzym B und/oder Perforin in den untersuchten Gebieten im menschlichen Rückenmark erbrachten. Granzym B und Perforin werden unter anderem von zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert und dienen deshalb als Marker für zytotoxische T-Lymphozyten. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Positivkontrolle des Antikörpers gegen Granzym B, in der zytotoxische T-Zellen in Lymphknotengewebe positive Signale zeigen (Abbildung 11).

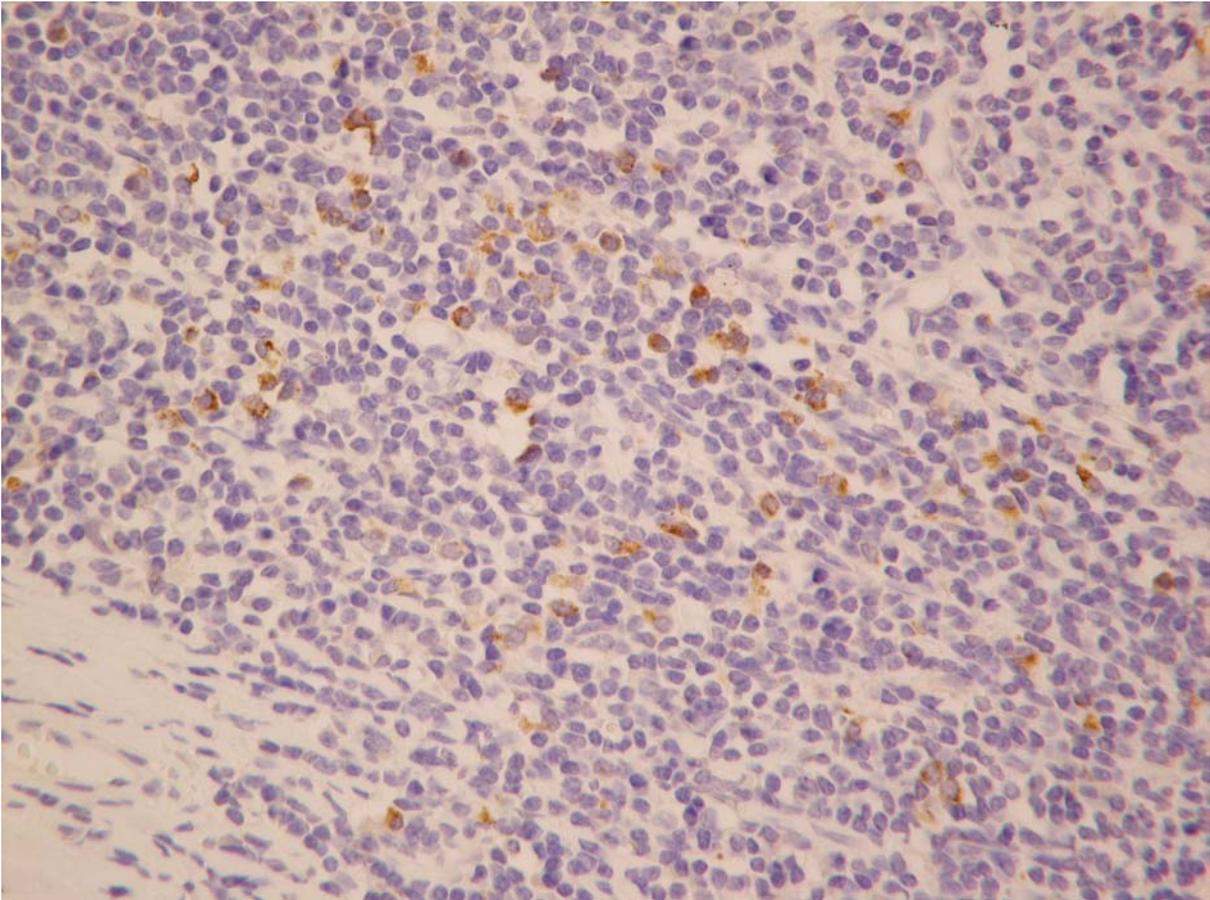


Abbildung 11: Positivkontrolle der Granzymfärbung mit zytotoxischen (Granzym-positiven) T-Lymphozyten im Lymphknotengewebe

Weiterhin wurden exemplarische Färbungen mit CD25 als Marker für aktivierte Lymphozyten sowie regulatorische Subpopulationen und sowie mit Foxp3 als Marker für regulatorische T-Zellen vorgenommen. Abgesehen von dem vereinzelt Auftreten von CD25-Oberflächenmolekülen konnten keine Hinweise auf aktivierte Lymphozyten oder regulatorische T-Zellen beobachtet werden (bei guten Positivkontrollen).

3.4. Lage der Lymphozyten

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass die detektierten Lymphozyten über den gesamten Rückenmarksquerschnitt ungleichmäßig verteilt, einzeln und ohne erkenntliche Ordnung gefunden wurden.

Im perivaskulären Raum, besonders von größeren Gefäßen, ließ sich gelegentlich eine Anhäufung von Lymphozyten beobachten. In der parenchymalen Umgebung des Gefäßes konnte jedoch kein verstärktes Auftreten von Lymphozyten beobachtet werden.

Im Folgenden wird die Lage der Lymphozyten in Relation zu verschiedenen anatomischen Gegebenheiten, wie beispielsweise der Lage zu Gefäßen, entlang der Neuroachse oder in Relation zu anatomischen Nerven-Leitungsbahnen dargestellt.

3.4.1. Lage der Lymphozyten in Relation zu den Gefäßen

Die verschiedenen Lymphozyten wurden anhand ihrer Lage in eine perivaskuläre Population und in eine (intra-) parenchymatöse Population unterschieden.

Als parenchymatös gelegen wurden alle Lymphozyten bezeichnet, die rundum von Rückenmarksparenchym umgeben waren. Alle Lymphozyten, die im perivaskulären Raum an ein Gefäß angrenzend lagen, wurden als perivaskuläre Lymphozyten bezeichnet.

Überraschenderweise war die durchschnittliche perivaskuläre Gesamt-Lymphozytenpopulation minimal kleiner als die parenchymatöse Lymphozytenpopulation. Während sich für CD8 die Situation nahezu ausgeglichen darstellte, und bei CD3 (siehe Abbildung 12) ein leichter Überhang auf der Seite der perivaskulären Zellen zu verzeichnen war, zeigte sich für den Antikörper CD20 die Balance leicht auf die Seite der parenchymatösen Zellen verschoben (siehe Abbildung 12).

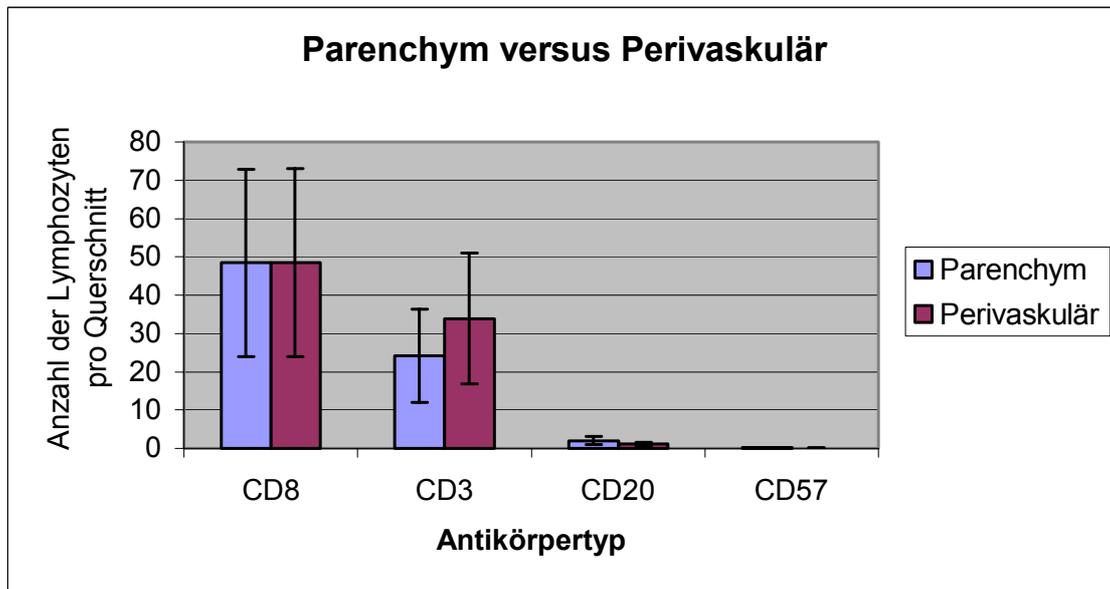


Abbildung 12: Lage der Lymphozyten bezüglich der Gefäßsituation

3.4.2. Verteilung der Lymphozyten in grauer und weißer Substanz

Das menschliche Rückenmark ist in seinem Aufbau um ein Vielfaches homogener als das menschliche Gehirn. Trotzdem ist die Morphologie des menschliche Rückenmarks nicht komplett gleichförmig: Im zervikalen und lumbalen Bereich weist das Rückenmark jeweils eine Verdickung (Vergrößerung des Querschnitts) auf und auch das Verhältnis von grauer zu weißer Substanz ändert sich im Verlauf von zervikal nach sakral mehrfach (siehe Abbildung 13).

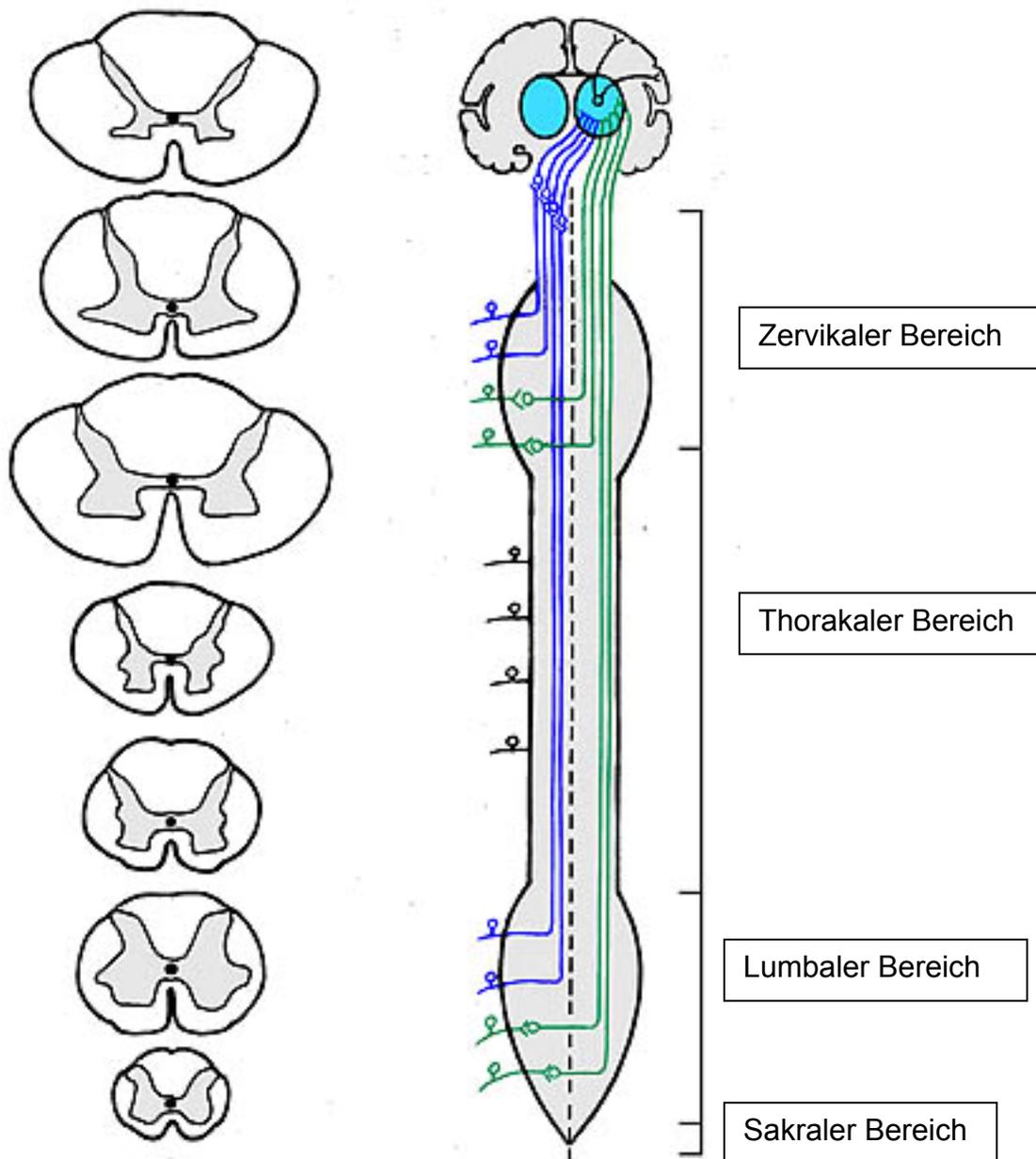


Abbildung 13: Das menschliche Rückenmark mit typischen anatomischen Begebenheiten (nach med. Fakultät der Universität Düsseldorf¹)

¹www.uniduesseldorf.de/MedFak/mai/2004/content/neuroanatomie/themen/Na_Q/img/Q06_01ab-1.jpg&imgrefurl

Aufgrund der in der oberen Abbildung dargestellten Unterschiede bezüglich der Verteilung von grauer und weißer Substanz sowie bezüglich der Querschnittsgröße entlang der Neuroachse können die folgenden Ergebnisse nur als Annäherung dienen, weshalb auf die Berechnung und Darstellung von Signifikanzen größtenteils verzichtet wurde.

Die Verteilung auf graue, bzw. weiße Bereiche zeigt auf allen Höhen eine deutlich größere Anzahl von Lymphozyten in den Gebieten mit markhaltigen Axonen (weiße Substanz). Diese Beobachtung kann vermutlich durch die durchschnittlich größere Fläche der weißen Substanz (im Gegensatz zur grauen Substanz) erklärt werden. Eine deutliche Konzentration von Lymphozyten in der grauen Substanz wie am Rattenmodell beobachtet (Bradl et al., 2005) konnte nicht beobachtet werden. Eine Beurteilung in Relation zur Fläche konnte aufgrund der interindividuellen Unterschiede und technischen Komplexität der Flächenberechnung der einzelnen Regionen sowie des Gesamtquerschnitts nicht durchgeführt werden.

Bei der Beurteilung der Lage der Lymphozyten bezüglich der Gefäßsituation fällt in der grauen Substanz eine Dominanz der perivaskulär gelegenen Lymphozyten auf, die im Kontrast zu der leichten Prädominanz der parenchymalen Zellen in der weißen Substanz steht.

Interessanterweise wurde eine geringere Gefäßdichte in der weißen Substanz (im Vergleich zur grauen Substanz) beschrieben (Craigie, 1920; Weiss et al., 1982), was sich jedoch im Rahmen dieser Untersuchungen nicht in einer reduzierten Lymphozytendichte in der weißen Substanz widerspiegelte.

Da im nächsten Kapitel (3.4.3.) noch detaillierter auf die Lage der Lymphozyten in verschiedenen Regionen eingegangen wird, wurde hier nur exemplarisch die CD8-Population dargestellt. Auch für CD3, CD20 und CD57 gilt, dass absolut gesehen im Vergleich mehr Lymphozyten in der weißen Substanz gefunden wurden.

3.4.3. Regionale Verteilung der Lymphozytenpopulationen

Die Betrachtung der einzelnen Rückenmarksregionen stellt eine Spezifizierung der Verteilung der Lymphozyten auf die graue, bzw. weiße Substanz dar. Die Anzahl an gefundenen Lymphozyten in den Regionen Vordersäule, Seitensäule und Hintersäule entspricht dem Wert der weißen Substanz. Interessanterweise wurde eine geringere Gefäßdichte in der weißen Substanz (im Vergleich zur grauen Substanz) beschrieben (Craigie, 1920; Weiss et al., 1982).

Die vier Lymphozytensubtypen haben sich relativ ähnlich auf die sechs unterschiedenen Rückenmarksregionen verteilt (siehe Abbildung 14). Die beiden Regionen Seitensäule und Hintersäule beinhalten zum Teil höhere Anzahlen an Lymphozyten im Vergleich mit den anderen Regionen. Da die verschiedenen Regionen aber nicht einheitlich groß sind, kann keine Aussage über die Konzentration an Lymphozyten pro Gewebsfläche getroffen werden. Die aus Vorderhorn, Hinterhorn und um den Zentralkanal gelegenen Gewebe bestehende graue Substanz ist in den meisten Rückenmarksabschnitten deutlich kleiner als die weiße Substanz (siehe Abbildung 13), wodurch sich die niedrigeren Zahlen in diesen Bereichen erklären lassen.

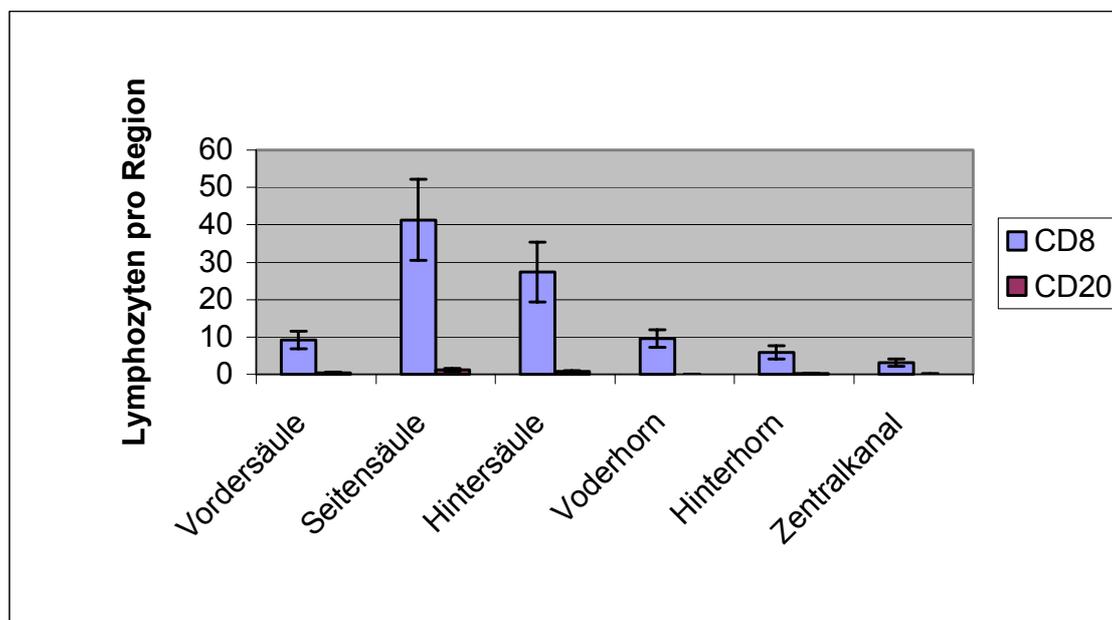


Abbildung 14: Verteilung der CD8- und CD20-Lymphozyten nach Rückenmarksregionen

3.4.4. Lage der Lymphozyten in Bezug auf die Rückenmarkshöhe

Bei dem Vergleich nach den verschiedenen Rückenmarkshöhen fällt bei den Ergebnissen von CD8 ein leichter Abfall der Lymphozytenzahl mit zunehmender Entfernung vom Gehirn auf (siehe Abbildung 15). Auch in diesem Fall wurde aufgrund der unterschiedlichen anatomischen Begebenheiten und ungleichen Flächenverteilung auf eine statistische Auswertung verzichtet. Da die lumbosakralen Querschnitte des menschlichen Rückenmarks (lumbosakrale Intumeszenz) in der Regel eine deutlich größere Fläche als die thorakalen Querschnitte haben, kann die abnehmende Lymphozytenanzahl mit zunehmender Entfernung vom Cerebrum jedoch als Hinweis auf ein abfallendes Konzentrationsgefälle gedeutet werden.

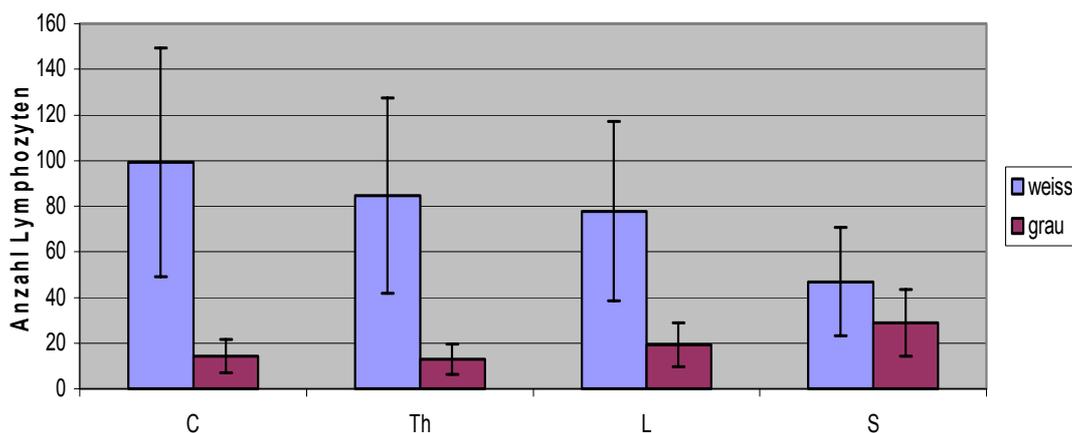


Abbildung 15: Einfluss der Rückenmarkshöhe auf die CD8-Population

Die Ergebnisse für CD3- und CD20- Lymphozyten zeigten ein vergleichbares Bild. Auch für die CD57-positiven Lymphozyten zeigte sich ein Abfall der Lymphozytenzahl nach sakral hin. Die sehr niedrigen Zahlen an gefundenen CD57-positiven Lymphozyten erlauben jedoch nur sehr bedingt aussagefähige statistische Aussagen über deren Verteilung.

3.5. Vergleich der verschiedenen Patientengruppen

Besonders die Anzahl der gefundenen Lymphozyten unterscheidet sich deutlich zwischen den einzelnen Patienten. Hingegen die Lage der Lymphozyten und die Aufteilung in Subtypen zeigten große Ähnlichkeiten beim Vergleich der einzelnen individuellen Rückenmarksproben.

Mehrere Patientenparameter wurden bezüglich ihrer Korrelation zur Lymphozytenanzahl untersucht, um möglichen Ursachen für sehr hohe oder niedrige Zahlen auf den Grund zu gehen. Insgesamt liegen jedoch unzureichende Informationen bezüglich der genauen Patientenanamnese vor, so dass bei zudem kleinem Patientenkollektiv nur bedingt statistische Aussagen gemacht werden konnten.

Da bekannt ist, dass eine Entzündung oder eine Malignomkrankung mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke einhergehen kann, wurden die Patienten mit einer entzündlichen Krankheit, bzw. mit einer bekannten Malignombehandlung gesondert betrachtet. Weiterhin wurden biologische Parameter wie Geschlecht und Alter in die Bewertung mit aufgenommen.

3.5.1. Lymphozytenverteilung in Abhängigkeit vom Lebensalter und Geschlecht

Wie bereits dargestellt unterschieden sich die einzelnen Individuen hauptsächlich in der Anzahl der gefundenen Lymphozyten, weshalb insbesondere nach Faktoren gesucht wurde, die mit der Menge an Lymphozyten korrelieren.

In Abbildung 16 wurden alle Patienten ihrem Alter nach aufgelistet. Es fällt eine Tendenz mit steigender Lymphozytenanzahl in erhöhtem Alter auf. An dieser Stelle soll daraufhin gewiesen werden, dass zum einen nur wenige Patienten im Alter unter 40 Jahren in der Stichprobe vorhanden waren und zum anderen die Wahrscheinlichkeit einer möglicherweise relevanten Nebenerkrankung mit höherem Alter steigt.

Antikörperzahl und -verteilung nach Alter und Geschlecht

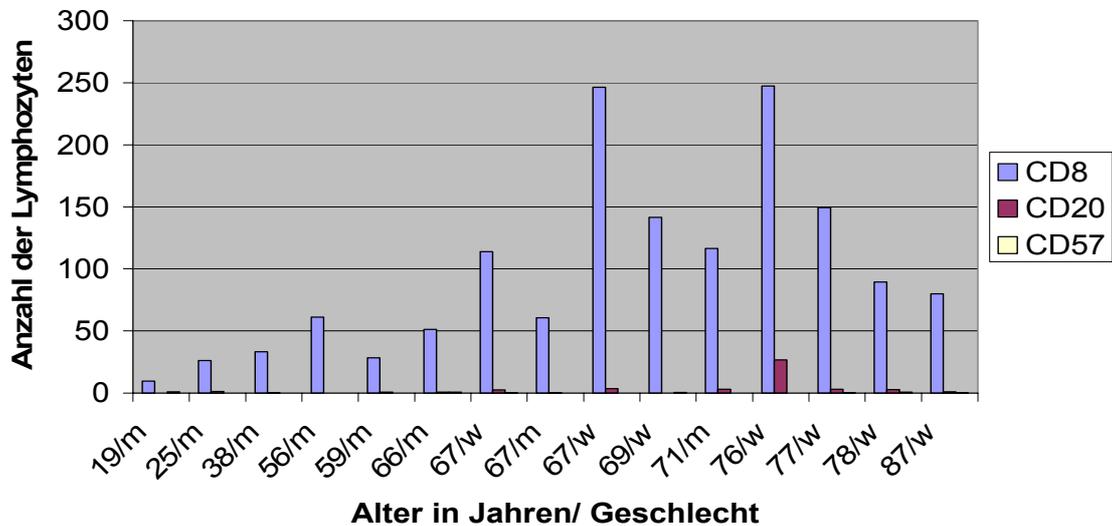


Abbildung 16: Gemittelte Lymphozytenanzahl und Aufteilung in Subtypen pro Rückenmarksquerschnitt nach Alter (in Jahren) und Geschlecht (m/w)

Wie bereits zuvor beschrieben zeigten sich große Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen bezüglich der Gesamtzahl der Lymphozyten. Insgesamt gesehen stellten sich jedoch ähnliche Verteilungsmuster bezüglich Lage und Subtypisierung der Lymphozyten dar.

Die Abbildung der Verteilung der CD3-Population nach dem Alter zeigte eine annähernd identische Aufteilung, die bei der zuvor beschriebenen Koexpression von CD3 und CD8 zu erwarten war.

Bei den Antikörpern CD8 und CD3 stellt das Lebensalter einen signifikanten Faktor für die Zunahme von Lymphozytenzahlen dar (CD8: $p=0,01$ bzw. CD3: $p=0,009$) – im Gegensatz zum Geschlecht, bei dem es zu keiner signifikanten Korrelation gekommen ist (CD8: $p=0,17$, bzw. für CD3: $p=0,42$).

Die Verteilung der CD20-positiven Zellen nach Lebensalter zeigte eine relativ gleichmäßige Verteilung (keine signifikanten Unterschiede, $p = 0,28$) – mit einer Ausnahme: bei einer Patientin, die mit 76 Jahren verstorben ist, wurde eine erhöhte Anzahl an CD20-Zellen detektiert.

Für die Auswertung bezüglich des Geschlechts wurden für CD20 wie für die übrigen Antikörper keine signifikanten Unterschiede gesehen (CD20: $p = 0,57$).

Bei den nur vereinzelt auftretenden CD57-Lymphozyten zeigte sich, dass in über 50% der Individuen keinerlei CD57-Zellen in den untersuchten Querschnitten nachweisbar waren. Signifikante Unterschiede bezüglich Alter oder Geschlecht traten nicht auf.

Der Faktor Geschlecht zeigte, dass weibliches Geschlecht im gewählten Kollektiv (6 Frauen, 9 Männer) mit durchschnittlich höheren Lymphozytenzahlen einherging (nicht signifikant, siehe oben). Da insbesondere in höherem Alter das weibliche Patientengut im Kollektiv Überhand hatte (Durchschnittsalter Frauen: 75,7 Jahre; Durchschnittsalter Männer: 52,0 Jahre) und höheres Alter zudem häufig mit Erkrankungen einhergeht, kann allerdings nicht grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass allein der Faktor weibliches Geschlecht ausschlaggebend für eine erhöhte Anzahl von Lymphozyten im Rückenmarksgewebe war.

3.5.2. Einfluss einer Entzündungskonstellation

Wie bereits in der Literatur beschrieben (Hickey, 2001), kann es bei einer Entzündung zu Veränderungen an der Blut-Hirn-Schranke kommen, weshalb Patienten, die an einer entzündlichen Allgemeinerkrankung erkrankt waren, beispielsweise einer Pneumonie, gesondert betrachtet wurden. Auch hier kann die folgende Beobachtung nur einen orientierenden Charakter haben, da genaue Daten fehlten.

Sieben Patienten wurden anhand von bekannten Diagnosen als Patienten mit einer wesentlichen entzündlichen Allgemeinerkrankung (z.B. Pneumonie) klassifiziert, wovon zwei Patienten außerdem an einer malignen Erkrankung litten (siehe Tabelle 1). Diese Daten können aufgrund der lückenhaften Anamnesedaten nur als grobe Einteilungen verstanden werden, die eventuell Hinweise auf Tendenzen geben können. Leider lagen keine Daten bezüglich der Blut- oder Liquorwerte der Verstorbenen vor, so dass diesbezüglich keine Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

Wie vermutet konnte man bei einer bestehenden entzündlichen Allgemeinerkrankung erhöhte Lymphozytenwerte im Rückenmark feststellt (Abbildung 17) (nicht signifikant).

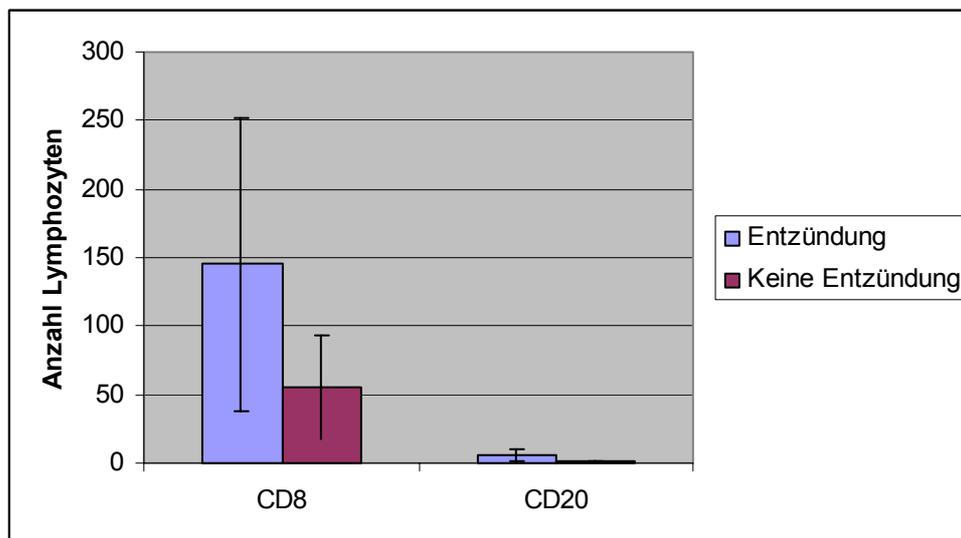


Abbildung 17: Vergleich der Gesamtlymphozytenzahl bei Entzündung und Abwesenheit von Entzündung

3.5.4. Einfluss einer malignen Erkrankung

Um der Frage nachzugehen, ob die Anwesenheit von maligne entarteten Zellen einen Einfluss auf die Lymphozytenanzahl im Rückenmark hat, wurden diejenigen Patienten mit bekanntem malignem Geschehen mit den übrigen Patienten verglichen. Die Patienten im Patientenkollektiv mit malignen Erkrankungen litten an CUP (zweimal), Bronchialkarzinom/Hypopharynxkarzinom und Adenokarzinom (insgesamt 4 Patienten) (siehe Tabelle 1). Es zeigten sich in der Malignomgruppe interessanterweise tendenziell niedrigere Lymphozytenzahlen als in der Kontrollgruppe (Abbildung 18).

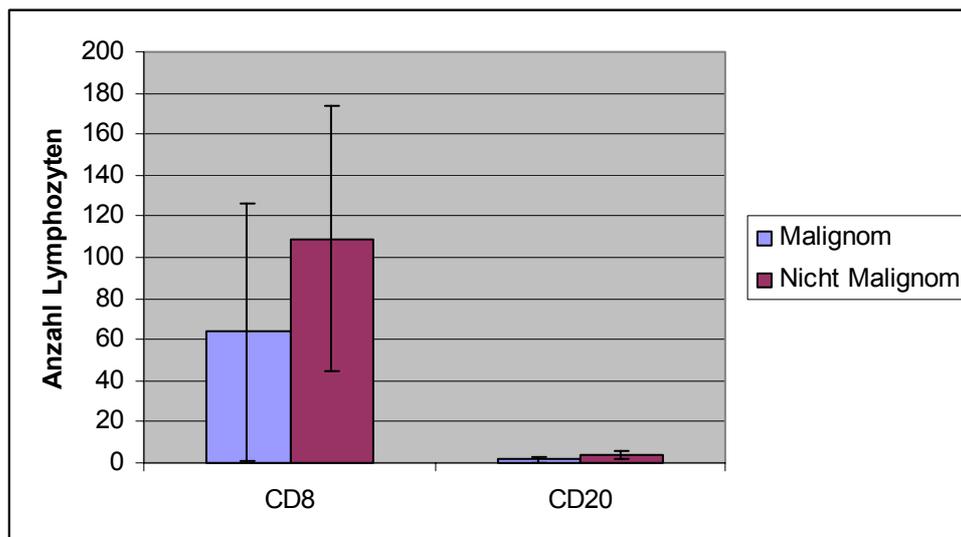


Abbildung 18: Vergleich der Fälle mit bekanntem Malignom im Gegensatz zu den Fällen ohne Malignom

3.5.5. Einzelfälle mit Auffälligkeiten in Verteilung oder Anzahl der Lymphozyten

Obgleich insgesamt gesehen die örtliche Verteilung und auch die Aufteilung auf die lymphozytären Subtypen - im Gegensatz zur Gesamtanzahl - im Patientenkollektiv sehr homogen waren, zeigten sich doch ein paar Besonderheiten.

Im Anhang findet sich zu jedem einzelnen Patienten eine Abbildung, die für diesen Fall die Verteilung in parenchymale und perivaskuläre Zellen sowie die Häufigkeit der Subtypen zeigt (siehe Anhang).

Drei Patienten/innen zeigten eine Anhäufung von perivaskulären Lymphozyten (ES 51/03, ES 199/02, ES 18/03), und eine Patientin (ES 212/02) zeigte eine deutliche Erhöhung sämtlicher Lymphozytentypen, insbesondere der CD20-Fraktion (siehe Abbildung 7).

Der Fall ES 33/02 zeigte überraschend niedrige CD3-Zahlen im Vergleich zur detektierten CD8-Population und intraparenchymatöse Anhäufungen von CD8-Lymphozyten.

3.6. Ergebnisse der Doppelfärbungen

Die exemplarisch durchgeführten Doppelfärbungen dienten zum einen dem Ausschluss einer Expression von CD8 auf Mikrogliazellen (Jander et al., 1998) und zum anderen zur Bestätigung einer Ko-Expression von CD3 und CD8 auf zytotoxischen/suppressorischen T-Zellen.

In den Doppelfärbungen mit CD68/CD8 konnte keine relevante Expression von CD8 auf den mit CD68 markierten Mikrogliazellen festgestellt werden, so dass unter zusätzlicher Beachtung morphologischer Kennzeichen CD8 als spezifischer Lymphozytenmarker angesehen wurde.

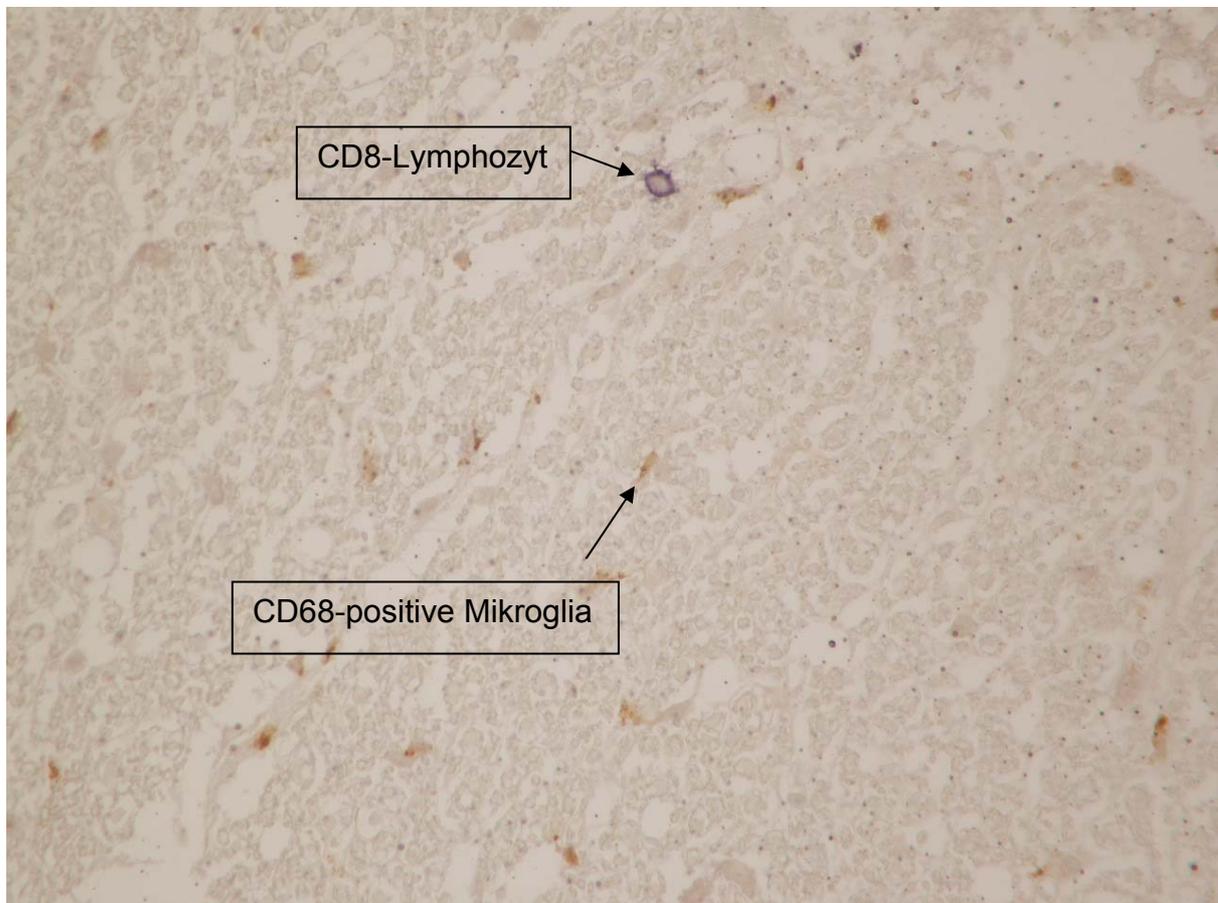


Abbildung 19: Doppelfärbung CD8 und CD68

In den Doppelfärbungen mit CD3/CD8 (Abbildung 20) zeigten sich in der Mehrzahl doppelt positive Lymphozyten (CD3-positiv und CD8-positiv).

Vereinzelt konnten jedoch auch CD3-negative/CD8-positive Zellen detektiert werden. CD3-negative/CD8-positive Zellen können eine Erklärung für die in dieser Studie beobachtete (wenn auch nicht signifikante) Überzahl der CD8-Zellen gegenüber den CD3-Zellen bieten. CD3-negative/CD8-positive Zellen wurden bis jetzt nur im Rahmen von NK-Zell-Subpopulationen beschrieben, eine weiterführende Diskussion diesbezüglich findet sich in Kapitel 4.1..

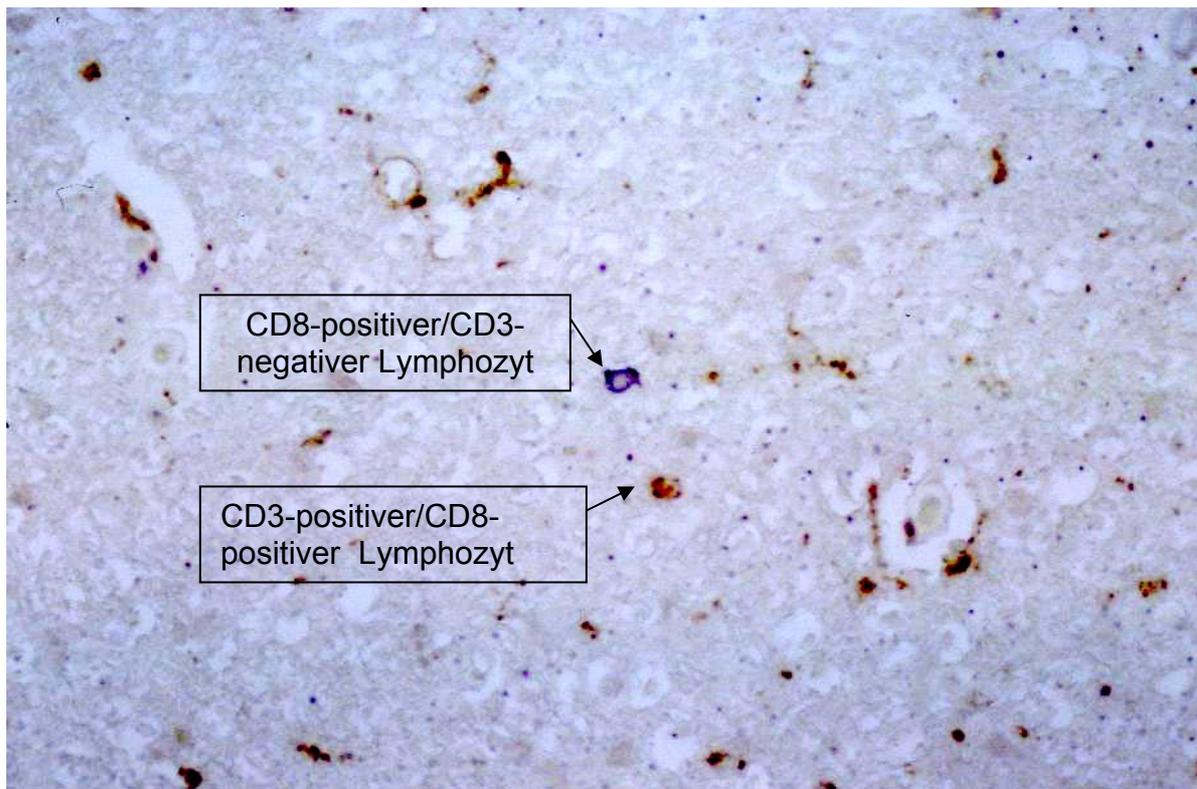


Abbildung 20: Doppelfärbung mit CD8 und CD3

CD3-positive/CD8-negative Zellen können unter anderem der T-Helferzellpopulation angehören, obwohl diese Population in anderen Studien in sehr geringem Maße, bzw. überhaupt nicht zu detektieren war. Auch die Ergebnisse dieser Studie deuten auf eine faktische Abwesenheit von CD4-Lymphozyten hin, da die CD3-Detektion hinter der CD8-Detektion zurücklag und in der exemplarisch durchgeführten Doppelfärbung mit CD3 und CD8 keine CD3-positiven und CD8 negativen Zellen mit typischer Lymphozytenmorphologie gefunden wurden.

3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Durchschnittlich wurden ca. 100 Lymphozyten (Summe aus CD8-Lymphozyten, CD20-Lymphozyten und CD57-Lymphozyten) pro Rückenmarksquerschnitt detektiert. (Eine Ko-Expression von CD8 und CD57 konnte nicht mit finaler Sicherheit ausgeschlossen werden. Aufgrund der minimalen Anzahl an CD57-Lymphozyten von ca. 0,25/Querschnitt würde das jedoch keinen relevanten Unterschied bezüglich der Gesamtsumme bedeuten).
2. Bei allen Patienten und in allen Regionen waren die CD3- und CD8-Subpopulationen die mit Abstand prädominanten Subpopulationen, gefolgt von CD20 und CD 57.
3. In exemplarischen Färbungen konnten weder Granzym B noch Perforin im menschlichen Rückenmark nachgewiesen werden.
4. Als Marker für regulatorische CD4-T-Zellen wurde Foxp3 eingesetzt, der im menschlichen Rückenmark nicht detektiert werden konnte.
5. Die Anzahl der CD20-Population und der CD57-Population unterschieden sich signifikant zugunsten einer höheren Anzahl von CD20 Zellen.
6. CD3 als Gesamtzellmarker detektierte nicht-signifikant niedrigere Lymphozytenzahlen als CD8.
7. Im parenchymalen Gewebe und im perivaskulären Raum wurden in der Regel annähernd gleiche Lymphozytenzahlen gefunden.
8. Ebenso ließ sich für die Verteilung der Lymphozyten in der grauen und weißen Substanz kein eindeutiger Unterschied feststellen.

9. Entlang der Neuroachse trat eine Abnahme der Lymphozytenzahl nach kaudal auf.
10. Die Hauptunterschiede zwischen den einzelnen Patienten lagen in der Anzahl der Lymphozyten, wohingegen Lage und Subtypisierung sehr homogene Muster zeigten.
11. Eindeutige Einflüsse des Geschlechts oder aber von pathologischen Zuständen wie z.B. einer Malignomerkrankung oder einer entzündlichen Grunderkrankung auf die lymphozytären Populationen im Rückenmark konnten nicht gesehen werden.
12. Hingegen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der lymphozytären CD8- und CD3-positiven Populationen mit dem Alter.
13. Vereinzelt konnten CD3-negative/CD8-positive Lymphozyten detektiert werden.
14. Eine Expression von CD8 auf CD68-positiven Mikrogliazellen konnte nicht beobachtet werden.

4. Diskussion

Im folgenden Kapitel werden am Anfang jedes Abschnitts die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen wiederholt und anschließend diskutiert.

4.1. Anwesenheit von Lymphozyten im Rückenmark auch im Gesunden

Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass sich im menschlichen Rückenmark regulär Lymphozyten finden, wenn auch in verhältnismäßig geringer und individuell unterschiedlicher Anzahl.

Obgleich am gesunden Menschen und speziell im menschlichen Rückenmark bisher keine grundlegenden Untersuchungen bezüglich der Lymphozytenpopulation durchgeführt worden waren, waren in Kontrollgruppen und in Tierversuchen bereits Lymphozyten im Rückenmark und Gehirn gefunden worden, so dass das reguläre Vorhandensein von Lymphozyten im menschlichen Rückenmark zu erwarten war. Wir konnten somit zeigen, dass das Rückenmark bezüglich der Anwesenheit von Lymphozyten keine Ausnahme bildet und dass auch bei gesunden Menschen, Lymphozyten im Rückenmarksparenchym zu finden sind.

Diese Erkenntnis unterstützt das Postulat, dass Lymphozyten im ZNS ebenso wie in anderen Geweben vorkommen, obgleich bekannterweise die Transmigration ins ZNS-Gewebe sowie der Aufenthalt im Gewebe erschwert sind und besondere Bedingungen (insbesondere eine verringerte Anzahl) vorliegen.

Die durchschnittliche Anzahl an Lymphozyten pro Querschnitt von 3,5 µm Dicke betrug ca. 100 Zellen, jedoch mit starken Schwankungen.

Die durchschnittlich gefundene Anzahl an CD8/CD20/CD57-Lymphozyten pro Querschnitt entspricht vage den in der Literatur beschriebenen Größenordnungen, ist jedoch eher leicht erhöht. Ein genauer Vergleich ist aufgrund mangelnder Einheit in den Ausgangsbedingungen (z.B. Dicke des Querschnitts, unterschiedliche Bezugsgrößen) nicht möglich.

Diskussion

Im Rattengewebe zeigten sich beispielsweise durchschnittlich weniger als 5 CD8-Lymphozyten pro Rückenmarksquerschnitt (Bradl et al., 2005).

Obgleich sich die Zahl der Lymphozyten im Promillebereich in Relation zur Gesamtheit aller Zellen in einem Rückenmarksquerschnitt bewegt, so ist sie doch in Relation zu den ursprünglich erwarteten Zellzahlen als eher hoch anzusehen.

Eine Ko-Expression von CD8 und CD57 konnte nicht mit finaler Sicherheit ausgeschlossen werden. Aufgrund der minimalen Anzahl an CD57-Lymphozyten von ca. 0,25/Querschnitt würde das jedoch keinen relevanten Unterschied bezüglich der Gesamtsumme bedeuten.

Es bestanden verhältnismäßig große interindividuelle Unterschiede in der Lymphozytenanzahl.

Interindividuelle Schwankungen in der Anzahl der gefundenen Lymphozyten mit Durchschnittswerten zwischen 10 Lymphozyten/Querschnitt und 274 Lymphozyten/Querschnitt konnten beobachtet werden. Diese Unterschiede können „normale“ interindividuelle Schwankungen und damit Grenzwerte des Normbereichs darstellen oder „pathologisch“ hohe, bzw. niedrige Werte enthalten. Da keine ausführlichen Vergleichsdaten oder gar Normbereichsdefinitionen für die Anzahl von Lymphozyten im menschlichen Rückenmark existieren, kann die beobachtete Spannbreite erste Anhaltspunkte bieten.

Patienten mit einer entzündlichen Allgemeinerkrankung zeigten tendenziell erhöhte Lymphozytenwerte.

Anhand von den vorhandenen biologischen Daten wurde versucht, mögliche Ursachen für die unterschiedliche Häufigkeit der Lymphozyten auszumachen. Ein Zusammenhang zwischen erhöhter Lymphozytenzahl und entzündlicher Allgemeinerkrankungen konnte dargestellt werden.

Aufgrund von einem gehäuften gemeinsamen Auftreten beispielsweise von hohem Lebensalter und weiblichem Geschlecht konnte eine eindeutige

Zuordnung nicht stattfinden. Die Datenlage zur Beurteilung derartiger Zusammenhänge war leider unzureichend.

Das Lebensalter wurde in der Literatur mehrfach beschrieben, Einflüsse auf das Immunsystem zu haben: Die Reaktivität der Mikrogliazellen ist bei Altersextremen erhöht (Mikroglia reagieren auf sterbende neuronale Elemente) und die akute Infiltration von Neutrophilen tritt verstärkt bei jugendlichen Nagern auf (Galea et al., 2007). Auch Anzahl und Funktion von Lymphozyten scheint in gewissen Maßen vom Lebensalter beeinflusst zu werden (Bradl et al., 2005; Aspinall, 2003). Bradl und Kollegen konnten beispielsweise einen Anstieg der Lymphozytenzahl mit zunehmendem Alter der Ratten feststellen (Bradl et al., 2005).

Möglicherweise lässt sich der positive Zusammenhang auch durch die häufige Anwesenheit von entzündlichen Allgemeinerkrankungen und anderen Erkrankungen bei Menschen in höherem Lebensalter (Aspinall, 2003) erklären, da einige Erkrankungen zu erhöhter Durchlässigkeit bis hin zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke führen können (Hickey, 2001; Johnson et al., 2007; Hawkins und Egleton, 2008). Da auch schon berichtet wurde, dass Mediatoren, die von den ins ZNS migrierenden Lymphozyten selbst gebildet wurden, zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke führen können (Chavarria und Alcocer-Varela, 2004), wäre das ebenfalls eine Erklärung für eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke bei Entzündung. Die Anzahl der detektierten Lymphozyten konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig mit einzelnen biologischen Faktoren korreliert werden.

Im menschlichen Zerebrum ließ sich kein Zusammenhang der Lymphozytenanzahl mit der klinischen Diagnose Sepsis oder mit dem Geschlecht herstellen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen am Rückenmark zeigte sich im Zerebrum ein Abfall der Lymphozytenzahl mit zunehmendem Alter (unveröffentlichte Daten von Löffler, 2006).

Bei Patienten mit bekannter maligner Erkrankung ließen sich tendenziell weniger Lymphozyten darstellen. Eventuell ist diese Beobachtung auf eine vorausgegangene immunsuppressive Therapie zurückzuführen, jedoch fehlen auch hier detaillierte Informationen der Patientenanamnese. Eine weiterführende beispielsweise von Art und Stadium des Tumors abhängige Beurteilung könnte insbesondere für Hirntumore interessant sein.

An Subtypen konnten CD8 und CD3 mit Abstand am häufigsten nachgewiesen werden, gefolgt von CD20 und schlussendlich von CD57 (jeweils signifikante Unterschiede).

Somit konnte die Erkenntnis von Bradl et al. (2005) bestätigt werden, dass CD8-exprimierende Lymphozyten im Rückenmarksgewebe eine deutliche Übermacht besitzen. Auch im menschlichen Zerebrum zeigte sich diese klare Dominanz der CD8-Subpopulation in allen untersuchten Regionen (unveröffentlichte Daten von Löffler, 2006). Die Ursache für diese Dominanz der CD8-Lymphozyten ist unklar – möglicherweise spielen erleichterte Transmigrationsbedingungen (z.B. durch die Expression von Interleukin IL-15R α (Bradl et al., 2005)) und/oder bessere Überlebensbedingungen, bzw. ein längerer Aufenthalt im Rückenmark-/ZNS-Gewebe eine Rolle. Interessanterweise ist mit der Dominanz der CD8-Population und einer faktischen Abwesenheit von CD4-Zellen im Rückenmarksgewebe das Verhältnis der Lymphozytensubpopulationen im Blut und im CSF (Svenningsson et al., 1995) ins Gegenteil gekehrt, was die Spezifität der lymphozytären Immunüberwachung im ZNS deutlich macht.

So konnte Hawke 1998 in seinen Experimenten an Mäusen zeigen, dass nach einer Infektion mit einem neurotrophen Influenzavirus bis zu 320 Tage danach noch Influenza-spezifische Gedächtniszellen nachweisbar waren und dass bis 56 Tage nach der ZNS-Infektion die Anzahl der CD8-Zellen anhaltend hoch blieb (Hawke et al., 1998).

Da die CD8-positive Lymphozytenpopulation die größte und zudem einzige in relevanter Anzahl auftretende Subpopulation der CD3-positiven T-Zell-Population im menschlichen Rückenmark ist, erscheint es wahrscheinlich, dass

diese Zellen eine wesentliche Rolle in der Immunabwehr, bzw. in der Immunüberwachung des ZNS spielen und eventuell ein Bindeglied zwischen peripherem Immunsystem und dem immunprivilegierten ZNS darstellen.

CD20-Lymphozyten wurden in sehr geringer Anzahl beobachtet. B-Zellen als Vorläufer der Antikörper produzierenden Plasmazellen sind ein wesentlicher Bestandteil der spezifischen Immunreaktion. Anders als bei den T-Zellen können B-Zellen über ihren verlängerten Arm der Antikörper viele Bereiche des Körpers gut erreichen ohne selbst jedes Gewebe überwachen zu müssen. Im Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Daten wurden auch bei den B-Lymphozyten im Rückenmarksgewebe höhere Zahlen detektiert.

Die CD57-positive NK-Zell-Population scheint im menschlichen Rückenmark nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da nur sehr vereinzelt CD57 nachgewiesen werden konnte. Da CD57 nur auf ca. 60% der aktiven NK-Zellen exprimiert wird, kann die absolute NK-Zell-Zahl über der hier ermittelten Zahl liegen. Eine weitreichende Funktion der NK-Zellen im Rückenmark bleibt jedoch unwahrscheinlich.

Es konnte keine Expression von Granzym B oder Perforin im menschlichen Rückenmark detektiert werden (exemplarisch).

Granzym B und Perforin sind lytische Enzyme, die obligat bei der zytotoxischen Immunabwehrreaktion durch T-Zellen freigesetzt werden. Frisch isolierte periphere Blutlymphozyten gesunder Personen enthalten zu ca. 12,7 % Granzym B. Perforin wurde von ca. 17,3 % der Lymphozyten exprimiert (Boettcher, 2005).

Die Abwesenheit von Granzym B und Perforin im menschlichen Rückenmark spricht gegen die Anwesenheit einer relevanten Anzahl von zytotoxischen Zellen im menschlichen Rückenmark. Die detektierten CD8-positiven Zellen scheinen somit nicht zum zytotoxischen T-Zell-Typ zu gehören bzw. noch keine aktivierten zytotoxischen T-Zellen darzustellen. In Untersuchungen am menschlichen Zerebrum zeigte sich ebenfalls eine Abwesenheit von Granzym B und Perforin (unveröffentlichte Daten von Löffler, 2006).

Neben dem zytotoxischen CD8-Lymphozyten gibt es in der Gruppe der CD3-positiven/CD8-positiven Zellen eine weitere Untergruppe, die der suppressorischen T-Lymphozyten. Suppressorische T-Zellen vom CD8-Typ (CD8-positiv TCR $\alpha\beta^+$ Treg) hemmen Immunreaktionen. Genauere Mechanismen der Immunsuppression dieser Zellen sind nur ansatzweise verstanden, da CD8-positiv TCR $\alpha\beta^+$ Treg eine sehr inhomogene Gruppe von suppressorischen Zellen bildet. Bis jetzt konnte kein eindeutiger phänotypischer Marker für CD8-positiv TCR $\alpha\beta^+$ Treg identifiziert werden. Stattdessen wurden verschiedene Moleküle, wie beispielsweise CD25, CD122, CD45RC^{low}, Foxp3 auf Untergruppen entdeckt. Eine weitere Untergruppe stellen die Qa-1 abhängigen CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\alpha\beta^+$ Tregs dar. Verschiedene Funktionsmechanismen konnten beobachtet werden: 1. Direktes Töten der Zielzelle 2. Aussenden negativer Signale auf die Zielzelle oder auf APCs 3. Sekretion von flüssigen Substanzen, z.B. immunsuppressiven Zytokinen (Smith und Kumar, 2008).

Im EAE-Model konnte gezeigt werden, dass CD8-Lymphozyten ein Schutz gegen Rezidive des Multiple-Sklerose Modells sein können (Jiang et al., 1992). Tierversuche von Najafian et al. (2003) zeigten, dass die Suppression von CD4-Zellen durch CD8-Zellen von Zell-zu-Zell-Kontakt und der Anwesenheit von APCs abhängig war (Najafian et al., 2003).

In wieweit diese Mechanismen und die Gruppe CD8+ TCR $\alpha\beta^+$ Tregs im ZNS relevant sind, bleibt unklar. Möglicherweise beruht aber gerade die Abwesenheit von CD4-Zellen im ZNS auf der Arbeit und Funktion von diesen nicht-zytotoxischen CD8-Zellen, die eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs spielen könnten. Obwohl bei einigen Funktionsmechanismen der CD8+ TCR $\alpha\beta^+$ Tregs Perforin eine Rolle zu spielen scheint (Correale und Villa, 2008; Najafian et al., 2003), kann die Abwesenheit von Perforin jedoch nicht als Ausschlusskriterium für CD8+ TCR $\alpha\beta^+$ Tregs gelten.

Als dritte Option könnten die CD3-positiven/CD8-positiven/GranzymB-negativen/Perforin-negativen Zellen Gedächtniszellen sein. Vorläuferzellen der CD8-Gedächtniszellen sind wahrscheinlich aktivierte T-Zellen, von denen einige zu Gedächtniszellen differenzieren. (Janeway et al., 2005, S.447).

Zwei Untergruppen von menschlichen Gedächtniszellen sind beschrieben worden: 1. Zentrale Gedächtniszellen (central memory T-cell = T_{CM}) mit dem CD45RO/CCR7+ Phänotypen, die hauptsächlich Interleukin 2 produzieren und nach weiterer Stimulation zu Effektor-Gedächtnis-Zellen werden können. 2. Effektor-Gedächtnis-Zellen (effector Gedächtnis = T_{EM}) mit dem CD45RO/CCR7- Phänotyp, die sehr schnell Effektorzytokine freisetzen können (Sallusto et al., 2004). Granzym wird auf CD8-Gedächtniszellen nur auf späten T_{EM} exprimiert (Takata und Takiguchi, 2006).

T_{EM} zirkulieren auch außerhalb der lymphoiden Organe und behalten einige Effektorfunktionen (Sallusto et al., 1999). Somit wäre prinzipiell möglich, dass die gefundenen CD8-positive/Granzym-negative Zellen zumindest teilweise Gedächtniszellen vom T_{CM} - oder vom frühen T_{EM} -Typ sind.

Nach Dengue-Virus-Infektion wurde ein starker Zustrom von CD8-T-Zellen ins Gehirn von Mäusen sowie eine Retention von virus-spezifischen CD8-T-Zellen beobachtet. Die bleibenden T-Zellen zeigten einen teilweise aktivierten, teilweise Gedächtniszell-typischen Phänotyp, im Verlauf kam es jedoch zu einer Veränderung zum Gedächtniszelltyp hin mit abnehmenden zytolytischen Oberflächenmarkern. Bis zu 30% der CD8-Zellen im ZNS waren spezifisch für das Virus, wobei im Verlauf von 56 Tagen die Anzahl der CD8-Zellen insgesamt zunahm (van der Most et al., 2003). Homann und Kollegen beschrieben sogar, dass nach einer Virusinfektion CD8-Gedächtniszellen über 3 Jahre in stabiler Anzahl zu finden waren, während CD4-Gedächtniszellen zurückgingen (Homann et al., 2001). Möglicherweise sind ein Teil der im menschlichen Rückenmark gefundenen CD8-Zellen also übrig gebliebene Gedächtniszellen, die bis zu mehrere Jahre nach einer ZNS-Infektion (eventuell einschließlich neurotropher Viren) im Gewebe persistieren.

In dieser rein deskriptiven Arbeit können nur bedingt Aussagen über die Funktion der gefundenen Zellen getroffen werden.

Am wahrscheinlichsten scheint jedoch, dass die im menschlichen Rückenmark gefundenen CD8-Zellen teilweise dem Gedächtniszelltyp angehören (insofern bereits ZNS-Erkrankungen durchgemacht worden sind) und teilweise einem

Diskussion

Suppressorzelltyp zuzuschreiben sind. Die suppressorischen Lymphozyten könnten eventuell an der Aufrechterhaltung und/oder Induktion des Immunprivilegs beteiligt sein.

In exemplarischen Färbungen konnte CD25 nur auf singulären Zellen nachgewiesen werden. Foxp3 war nicht detektierbar.

CD25 ist ein Aktivierungsmarker für Lymphozyten, der außerdem auf regulatorischen T-Zellen vom $CD8\alpha^+TCR\alpha\beta^+$ Typ beschrieben wurde (Cosmi et al., 2004). Die Annahme, dass vornehmlich aktivierte Lymphozyten ins Rückenmarksgewebe gelangen, wird durch die geringe Expression von CD25 im menschlichen Rückenmark in Frage gestellt. Zudem bedeutet die geringe, fast nicht vorhandene Expression von CD25 in Kombination mit der Abwesenheit von Foxp3, einem Marker für regulatorische T-Zellen (auch auf CD8-Treg (Manavalan et al., 2004)), dass der CD8-positive CD25-positive Treg Typ nicht vorliegt und dass nur Foxp3 negative CD8-Suppressortypen wie reife CD8-positive CD122-positive Zellen oder $CD8\alpha^+ TCR\alpha\beta^+$ Tregs in Frage kommen. Die Vielfalt der Subtypen der $CD8^+ TCR\alpha\beta^+$ Tregs und der Mangel an eindeutigen Markern macht die eindeutige Identifizierung der CD8-Tregs sehr schwierig. Aufgrund dieser Vielfalt ist trotz negativer Ergebnisse von CD25 und Foxp3 die Anwesenheit von $CD8^+ TCR\alpha\beta^+$ Treg nicht auszuschließen.

Die CD3-Expression unterscheidet sich nicht signifikant von der CD8-Expression.

Da die Differenz in den durchgeführten Untersuchungen nicht signifikant war, kann dieser Unterschied in der Expression von CD3 und CD8 durch zufällig bedingte Schwankungen der Lymphozytenanzahl erklärt werden und ist somit als gleichwertig anzusehen. Unter der Annahme, dass die meisten CD8-Zellen CD3 ko-exprimieren, deutet dieses Ergebnis somit auf eine Abwesenheit von anderen (nicht CD8-positiven) CD3-positiven Zellen hin. Daraus kann eine faktische Abwesenheit von T-Helfer-Zellen (CD3-positiv/CD4-positiv) gefolgert werden, wie sie bereits von Stoll et al. beschrieben worden war (Stoll et al., 2006).

Diskussion

In der Doppelfärbung waren zusätzlich zu CD3/CD8 doppelt positiven Lymphozyten auch wenige CD3-negative/CD8-positive Zellen detektiert worden.

Die Existenz von CD3-negativen/CD8-positiven Lymphozyten könnte den Überhang der CD8-Population gegenüber der CD3-Population erklären. Diese CD3-negativen/CD8-positiven Zellen sind bis jetzt in der Literatur nur als Subtyp von NK-Zellen beschrieben worden.

Die durchgeführte CD57-Markierung im Sinne einer NK-Zell-Detektion zeigte jedoch um ein vielfaches geringeres Ansprechen als die Differenz zwischen CD8-positiven Zellen und CD3-positiven Zellen ausmachen würde. Der Zelltyp müsste also großteils dem CD3-negativen/CD8-positiven/CD57-negativen Zellphänotyp entsprechen. Da CD57 nur einen Teil der NK-Zellen detektieren kann, wäre die Zugehörigkeit zu CD57-negativen NK-Zellen (z.B. CD56positiv) immer noch möglich. Die faktische Abwesenheit von Granzym B im menschlichen Rückenmark spricht allerdings ebenfalls gegen das Vorliegen von CD3-negativen/CD8-positiven/CD57-negativen NK-Zellen, da diese zu über 80% Granzym B exprimieren (Bade et al., 2005). Ein CD3-negativer/CD8-positiver/CD57-negativer/GranzymB-negativer Zelltyp scheint also im Blut nur äußerst selten aufzutreten.

Zu guter Letzt kann diese Ergebnis selbstverständlich auch im Lichte einer methodischen Schwäche gesehen werden, bei der beispielsweise die Antikörperlösung stellenweise zu dünn aufgetragen wurde oder die auf einer generellen geringeren Affinität des CD3-Antikörpers beruht, bzw. einer unspezifischen Anfärbung des CD8-Antikörpers.

Wie Olson et al. 2004 zeigen konnten, ist die Expression von CD3 auf CD4-Lymphozyten 1,7-fach stärker als auf CD8-Lymphozyten (Olson et al., 2004). Bei geringer Expression von CD3 auf CD8-Lymphozyten könnte auch das zu einem nicht sichtbaren Signal führen (bzw. nicht von der Hintergrundfärbung differenzierbaren Anfärbung). Alle CD8-Lymphozyten wurden zusätzlich zu ihrer Anfärbung auch morphologisch beurteilt und zeigten die typische Morphologie von Lymphozyten, zudem konnte in der Doppelfärbung mit CD68 gezeigt

Diskussion

werden, dass keine signifikante Expression auf Mikroglia detektierbar war, was eine unspezifische, zu hohe Anfärbung von CD8 unwahrscheinlich macht.

Bei bekannter geringerer Expression des CD3-Oberflächenmoleküls kann die Anwesenheit von singular CD8-positiven Lymphozyten (CD3-negativ/CD57-negativ/Granzym-negativ) somit durch eine methodische Schwäche oder die Anwesenheit von einzelnen, im Blut sehr seltenen atypischen CD8-NK-Zellen erklärbar sein.

In der Doppelfärbung waren zusätzlich zu CD3/CD8 doppelt positiven Lymphozyten auch wenige CD3-positive/CD8-negative Zellen beobachtet worden.

In der Zusammenschau mit der Tatsache, dass die CD3-Expression insgesamt unter der CD8-Expression lag und CD3 und CD8 bekannterweise ko-exprimiert werden, ist anzunehmen, dass die Population der CD3-positiven/CD8-negativen Zellen sehr gering ist und eventuell dem im ZNS-Parenchym doch vereinzelt auftretenden CD3-positiven/CD4-positiven Lymphozytentyp der T-Helferzellen entsprechen könnte.

Möglicherweise handelt es sich aber auch um CD3-positive/CD8-negative/CD4-negative Zellen, die zum ersten Mal 1989 von Strober und Kollegen nachgewiesen wurden (Strober et al., 1989). Diese doppelt negativen T-Zellen besitzen regulatorische, immunsuppressive Funktionen und können CD8-Lymphozyten mit der gleichen T-Zell-Rezeptorspezifität hemmen und die Abstoßung von Hauttransplantaten verhindern (Zhang et al., 2001). Im Blut scheinen 1 bis 5% der $\alpha\beta$ -TCR-positiven Lymphozyten doppelt-negativ zu sein (Zhang et al., 2007). Im Rahmen der Blutzirkulation könnten diese Zellen auch Zutritt zum ZNS-Gewebe erhalten. Eine Rolle bezüglich des Immunprivilegs wäre in diesem Fall vorstellbar. Nach der Übernahme von MHC-Peptidkomplexe von APCs können doppelt-negative Lymphozyten mit Effektor-T-Zellen (zum Beispiel einer CD8-positiven, zytotoxischen T-Zelle) interagieren und eine Fas-induzierte Apoptose in der Effektorzelle einleiten (Fischer et al., 2005).

Diskussion

Auch in diesem Fall muss das Vorliegen einer methodischen Schwäche diskutiert werden. Bei vereinzelterem Auftreten der CD3-positiven/CD8-negativen Zellen sowie besserer Affinität des CD8-Antikörpers erscheint diese Möglichkeit in diesem Fall jedoch unwahrscheinlich. Die singular CD3-positiven Lymphozyten sind deshalb am ehesten als vereinzelte Vertreter der CD4-positive T-Helferzellpopulation zu werten, bzw. als doppelt-negative regulatorische T-Zellen.

Die Lymphozyten waren im parenchymalen, bzw. perivaskulären Raum annähernd gleich verteilt.

Anders als vermutet ließen sich im parenchymalen und im perivaskulären Raum annähernd gleich große Lymphozytenpopulationen nachweisen. Dieses Ergebnis kann einerseits als Argument für eine gute Fortbewegungsfähigkeit der Lymphozyten gedeutet werden (nach Übertritt aus dem Gefäß ins Rückenmarksgewebe), andererseits können die perivaskulären Lymphozyten auch eine spezifische Gruppe bilden, die nur teilweise mit den intraparenchymalen Lymphozyten zusammenhängt. Beispielsweise wurde bei den perivaskulären Lymphozyten ein höherer Anteil von CD3-positiven Zellen beobachtet als bei den intraparenchymalen (was natürlich eventuell auch mit einer geringeren Anfärbbarkeit des CD3-Moleküls erklärbar wäre, welches sich im Gewebe schlechter vom Hintergrund abhebt).

Ähnliche Verteilung von Lymphozyten in grauer und weißer Substanz.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bradl et al. (2005) am Rückenmark der Ratte zeigte sich im menschlichen Rückenmark keine erhöhte Konzentration von Lymphozyten in der grauen Substanz. Absolut gesehen zeigte sich eine leicht reduzierte Anzahl von Lymphozyten in der grauen Substanz. Der hier beobachtete Unterschied zwischen grauer und weißer Substanz beruht aber am ehesten auf der unterschiedlichen Größe der grauen und weißen Fläche. Je nach Höhe zeigt sich ein unterschiedliches Verhältnis von grauer zu weißer Substanz – über alle Höhen betrachtet erscheint jedoch das Verhältnis von beobachteten Zellen in weißer zu grauer Substanz von ca. 4:1 als annähernd

Diskussion

mit den Flächenverhältnissen vereinbar. Eine lymphozytäre Überwachung erfolgt also in beiden Kompartimenten.

Bezüglich der Neuroachse zeigte sich kaudalwärts eine leicht abnehmende Lymphozytenzahl.

Wie Hickey bereits im Jahr 2001 feststellte ist der T-Zell-Übertritt ins Rückenmark höher als ins Cerebrum (Hickey, 2001). Bei den hiesigen Untersuchungen zeigte sich mit zunehmender Entfernung vom Großhirn jedoch eine Abnahme der Lymphozytenanzahl, die sich in Anbetracht der relativ großen Fläche im Bereich der lumbosakralen Intumeszenz nicht allein über Flächenunterschiede erklären lässt. Bei den Tierversuchen von Bradl et al. an der Ratte (2005) zeigte sich die Lymphozytenanzahl unabhängig von der Lage bezüglich der Neuroachse.

4.2. Weiterführende Fragen

Die gewonnenen Ergebnisse konnten zeigen, dass in normalem menschlichem Rückenmark regulär eine geringe Anzahl von Lymphozyten gefunden werden kann. Die gewonnenen Erkenntnisse werfen aber auch einige weitere Fragen auf, die im Folgenden besprochen werden sollen.

Die augenscheinliche Anwesenheit von CD3-negativen/CD8-positiven/Granzym-negativen Zellen sollte weiter abgeklärt werden. Liegt hier ein NK-Zell-Typ oder ein anderer Zelltyp vor? Wie ist das weitere Expressionsmuster dieser Zellen? Wie häufig ist dieser Zelltyp?

Weiterhin bleibt offen, wie und warum es zu einer Anhäufung von CD8-positiven Lymphozyten kommt. Kann das CD8-Molekül eine erleichterte Transmigration oder Apoptosehemmung bewirken? Halten sich die CD8-Lymphozyten längerer im ZNS-Gewebe auf?

Die Anwesenheit von CD3-positiven/CD8-positiven/Granzym-negativen Zellen legt eine suppressorische Funktion oder eine Gedächtnisfunktion nahe. Können diese Funktionen belegt werden? Was sind die genauen Funktionen dieser Zellen im speziellen Umfeld des ZNS? Können sie eventuell eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs oder in der Pathogenese der Multiplen Sklerose spielen?

Bedeutet die Abwesenheit von CD25, dass vor allem ruhende Lymphozyten im ZNS-Gewebe verweilen? Sind die langjährigen Erkenntnisse, dass nur aktivierte Lymphozyten die BBB überqueren können, mit diesen Ergebnissen vereinbar?

Haben die interindividuellen Unterschiede eine pathogenetische Relevanz? Lässt sich die Lymphozytenanzahl im ZNS-Gewebe mit der Blutlymphozytenzahl oder den Werten im CSF korrelieren? Lassen sich

Unterschiede an der Blut-Hirn-Schranke der verschiedenen Patienten finden? Wie führen die Faktoren erhöhtes Alter und die Anwesenheit von entzündlichen Allgemeinerkrankungen zu erhöhten Lymphozytenzahlen im Rückenmark? Können die Zahlen mit anderen Faktoren, beispielsweise der Anamnese von infektiösen ZNS-Erkrankungen (einschließlich neurotropher Viren, z.B. Ebstein Barr Virus) einhergehen?

Wie ist das Verhalten der Lymphozyten nach Eintritt ins ZNS-Gewebe? Da keine perivaskuläre Anhäufung beobachtet werden konnte, spricht das für eine vorhandene gute Mobilität der Lymphozyten im Rückenmarksgewebe? Wie lange halten sich die Lymphozyten im Rückenmark auf?

4.3. Lymphozyten als Induktoren des Immunprivilegs?

Wie bereits ausführlich dargestellt wurde, herrscht bekannterweise im menschlichen ZNS ein Zustand reduzierter Immunität, der im Allgemeinen als Immunprivileg bezeichnet wird. Viele Faktoren spielen nachgewiesenermaßen eine Rolle in der Induktion und Aufrechterhaltung des Immunprivilegs, unter anderem sind hier die Blut-Hirn-Schranke, der fehlende zelluläre Abfluss via das Lymphsystem und das Fehlen von professionellen APCs zu nennen.

Die reduzierte Anwesenheit von Lymphozyten im ZNS- und Rückenmarksparenchym wurde bisher häufig im Zusammenhang mit der Schutzfunktion des Immunprivilegs vor Entzündung gesehen. Dieser Aspekt ist sicherlich richtig, dennoch deuten die Spezifität der gefundenen Lymphozyten darauf hin, dass diese wenigen Lymphozyten zielgerichtet und mit spezifischen notwendigen Funktionen versehen im ZNS bestimmte Aufgaben wahrnehmen. Der Großteil der im Rückenmark gefundenen Zellen war CD8 und CD3 positiv, jedoch Granzym- und Perforin negativ, was auf zwei Lymphozyten-Subtypen passen könnte: 1. Immunsuppressorische CD8-Lymphozyten 2. CD8-Gedächtniszellen.

Diskussion

Bei fehlender Aktivität von CD25 und Foxp3 konnten bestimmte Gruppen von immunsuppressorischen Treg ausgeschlossen werden. Aufgrund einer großen Heterogenität innerhalb der CD3+/CD8+ Treg-Gruppe muss dennoch die Möglichkeit einer immunsuppressorischen Ausprägung dieser Zellen diskutiert werden.

Möglicherweise sind somit die eindringenden Lymphozyten nicht als „durchgewischte“ Zellen des reduzierten Arms des peripheren Immunsystems, die auf der Suche nach ihrem Antigen durch das ZNS patrouillieren, sondern als spezifische Zellen zu sehen, die einerseits eine wichtige Aufgabe in der Verhinderung von Reinfektionen haben könnten (Gedächtniszellen) und andererseits direkt zur Aufrechterhaltung und Induktion des Immunprivilegs beitragen könnten (immunsuppressorische Lymphozyten).

Durch immunsuppressorische Mechanismen könnten die CD8-Lymphozyten das immunsuppressive Mikroenvironment unterstützen und bei einer Infektion zur Begrenzung der Entzündung und insgesamt zur Verhinderung von Autoimmunität beitragen. Die vermutete Anwesenheit von doppelt-negativen regulatorischen Zellen spricht ebenfalls für die Rolle von T-Zellen in der Induktion und Aufrechterhaltung des Immunprivilegs. Doppelt negative regulatorische T-Zellen können beispielsweise aktivierte CD8-positive Lymphozyten apoptotisch zerstören und somit Immunreaktionen unterbinden (Young et al., 2003).

Für die Entstehungsprozesse neurologischer Erkrankungen mit inflammatorischer Genese werden Theorien diskutiert, die sich mit dem Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Komponenten auseinandersetzen. Bei Multipler Sklerose sind möglicherweise antiinflammatorische, T-Zellen hemmende Mechanismen defizient oder fälschlicherweise inhibiert, sodass es zu einem massiven Angriff auf zerebrales Myelin kommen kann (Comi et al., 2006).

4.4. Lymphozyten als Neuroprotektoren?

So verheerend die Folgen von Inflammation besonders in einem empfindlichen Gewebe wie dem ZNS auch sein können, die Präsenz von Lymphozyten kann nachgewiesenermaßen neben der Bekämpfung des fremden Agens auch unmittelbar positive Effekte, z.B. auf zerebrale Neurone, haben.

Bieber und Kollegen konnten einen neuroprotektiven, remyelinisierenden Effekt von CD4- und CD8-Lymphozyten nach Lysolecithin vermitteltem Myelinverlust bei Mäusen nachweisen (Bieber et al., 2003).

Der von aktivierten B- und T-Lymphozyten produzierte neurotrophe Gewebefaktor BDNF (brain derived neurotrophic factor) wirkt lokal auf die Neurone in protektiver Weise, indem er posttraumatischen neuronalen Abbau verhindert (Kerschensteiner et al., 1999).

Die zum Teil widersprüchlich wirkenden Funktionen der Lymphozyten im ZNS sind noch bei weitem nicht vollständig verstanden. Eine differenzierte Betrachtung in Gesundheit und Krankheit sowie eine weitere Spezifizierung der gefundenen CD8-Lymphozyten können dazu beitragen dieses komplexe System besser zu verstehen.

4.5. Diskussion der aufgefallenen Einzelfälle

Bei zwei Patienten fielen deutliche Besonderheiten auf, das war zum einen der Fall ES 212/02 mit der mit Abstand höchsten Anzahl an Lymphozyten und zum anderen der Fall ES 33/02 mit bekannter Amyotropher Lateraler Sklerose (ALS).

Der Fall ES 212/02 zeigte eine starke Erhöhung aller Lymphozytensubtypen, die sich von den übrigen Fällen abhob. Die Verteilung auf die Subpopulationen entsprach der üblichen Form (siehe Abbildung 21). Neuropathologisch konnten abgesehen von einer zerebralen Mikroangiopathie und M. Alzheimer, sowie einer Atrophie keine wegweisenden Befunde erhoben werden. Die Todesursache war globale Herzinsuffizienz bei bekannter koronarer Herzkrankheit. Abgesehen von einer entzündlichen Konstellation mit Fieber unklarer Genese und Durchfall waren keine weiteren wesentlichen Erkrankungen bekannt.

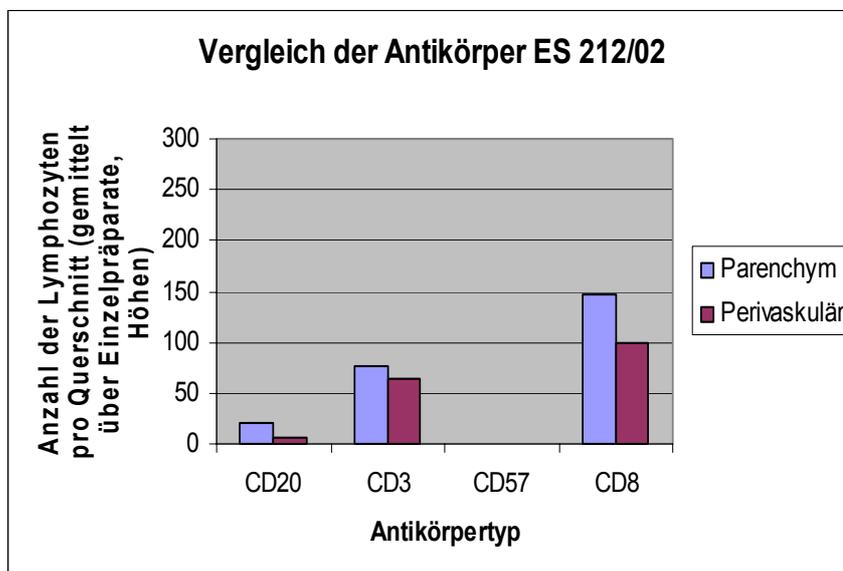


Abbildung 21: Fall 212/02 – Verteilung der Lymphozyten auf Subtypen

Der Fall ES 33/02 zeigte bei bekannter ALS eine Anhäufung von lymphozytären Zellen in der Region des Vorderhorns (siehe Abbildung 22). Abgesehen von insgesamt erhöhten Lymphozytenzellzahlen fiel eine relativ große Anzahl von CD20-Lymphozyten auf. Unter anderem von Engelhardt und Kollegen (1993)

waren bereits T-Helfer-Zellen in der Nähe zu degenerierenden kortikospinalen Trakten sowie zytotoxische/suppressorische T-Zellen im Gebiet des Seitenhorns beschrieben worden (Engelhardt et al., 1993). Der Fall 33/02 zeigte außerdem eine stark verminderte Expression von CD3 im Vergleich zu CD8. Der genaue Zusammenhang zwischen T-Zell-Infiltration und Pathogenese der ALS ist nicht bekannt. Sollte sich bestätigen, dass diese Lymphozyten hauptsächlich dem CD3-negativen/CD8-positivem Typus angehören, könnte dies zur weiteren Klärung der genauen Pathogenese beitragen.



Abbildung 22: Anhäufung von CD8-Lymphozyten bei bekannter ALS in der Region des Vorderhorns

4.6. Schlussfolgerungen

Aus den gewonnenen Erkenntnissen lassen sich vor dem Hintergrund des bisherigen Forschungsstands einige mögliche Schlussfolgerungen ziehen:

1. Lymphozyten kommen regulär im gesunden menschlichen Rückenmark vor und scheinen dort spezifischen Funktionen nachzugehen, die bis jetzt nicht vollständig verstanden sind und sogar widersprüchlich zu sein scheinen. Eventuell liegen verschiedene Untergruppen vor.
2. Die Dominanz der CD8-Population deutet auf einen spezifischen Blut-Hirn-Schranken-Transportweg und/oder Überlebensvorteil im ZNS hin.
3. CD20-Lymphozyten und CD57 scheinen nur eine untergeordnete Rolle in der Immunüberwachung des ZNS zu spielen.
4. Die Zuordnung der CD8-Population zu einer funktionellen Gruppe war nicht eindeutig möglich. Die durchgeführten Untersuchungen führten jedoch zu einer weitestgehend einheitlichen Abbildung, so dass bis jetzt davon ausgegangen werden kann, dass die Gruppe der CD3+/CD8+ -Lymphozyten im ZNS in ihrer weiteren Typisierung weitestgehend homogen ist. Die detektierten, bzw. ausgeschlossenen Oberflächenproteine können als Hinweis auf spezielle Untergruppen von immunsuppressorischen Zellen oder im Rahmen von Gedächtniszellen interpretiert werden, erscheinen jedoch im Großen und Ganzen in ihrer Ausprägung ungewöhnlich (in Bezug auf Blutlymphozytentypen).
5. Die faktische Abwesenheit des Aktivierungsmarkers CD25 steht im Widerspruch zu der Annahme, dass hauptsächlich aktivierte Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke überqueren können. Möglicherweise verlieren die Lymphozyten dieses Oberflächenprotein im Laufe ihres Aufenthalts im ZNS oder bisher wenig erforschte Übertrittsmechanismen liegen vor.

6. Die Verteilung der Lymphozyten im Gewebe scheint am ehesten zufällig ohne Korrelation zu funktionellen Einheiten, zu grauer oder weißer Substanz zu sein. Mit zunehmender Entfernung vom Großhirn scheint jedoch eine Abnahme der Lymphozytenkonzentration aufzutreten.
7. Ein CD3-negativer/CD8-positiver Lymphozytentyp wurde detektiert. Die Relevanz und Funktion dieses eventuell zur NK-Zell-Gruppe gehörenden Lymphozyten bleibt unklar.
8. Patienten in hohem Alter mit entzündlichen Allgemeinerkrankungen zeigen erhöhte Lymphozytenzahlen. Zum besseren Verständnis der Migration und Funktion der im ZNS vorhandenen Lymphozyten im Gesunden - als Grundlage und Referenz für ZNS-Pathologien - wäre wichtig herauszufinden, welche weitere Faktoren Einfluss auf Anzahl und Funktion der Lymphozyten im ZNS haben und wie und in welchem Ausmaß die oben genannten Faktoren wirken.
9. Die durchschnittlich gefundene Anzahl von ca. 100 Lymphozyten pro Rückenmarksquerschnitt kann einen ersten Referenzwert im humanen Gewebe darstellen. Zur genaueren Beurteilbarkeit sollte in Zukunft möglichst große Einigkeit bezüglich der Auszählmethoden hergestellt werden.
10. Weitere Forschung zur Klärung der offen gebliebenen Fragen und Widersprüchlichkeiten ist notwendig zur Erforschung der Normalsituation als auch zum besseren Verständnis von neurologischen Pathologien.

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Anwesenheit, Häufigkeit, Verteilung und Subtypisierung von Lymphozyten im menschlichen Rückenmarksgewebe (immunhistologische Beurteilung). Das Rückenmark als Teil des Zentralen Nervensystems ist ein immunprivilegierter Raum, der durch die Blut-Hirn-Schranke vom restlichen Körper abgegrenzt ist. Immunprivilegierte Räume zeichnen sich durch eine verminderte immunologische Reaktion (im Vergleich zu anderen Organen) aus, was lange Zeit unter anderem durch die Abwesenheit von Lymphozyten erklärt wurde. Bereits Ende der 80ziger konnte jedoch der Übertritt von Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke gezeigt werden (Wekerle et al., 1987). Die verbesserten immunhistologischen Methoden konnten im Verlauf auch die Anwesenheit von lymphozytären Zellen in geringer Anzahl im ZNS nachweisen.

Bei der Untersuchung von Rückenmarksgewebe von Ratten (Bradl et al., 2005) fiel eine überraschend hohe Konzentration von Lymphozyten auf, weshalb eine Evaluation am menschlichen Gewebe zur detaillierten Darstellung der Menge und Verteilung sowie Proteinexpression der Lymphozyten mit dieser Arbeit durchgeführt wurde. Durchschnittlich wurden ca. 100 im Gewebe liegende Lymphozyten pro 3,5 µm dickem Rückenmarksquerschnitt detektiert. Der Großteil der Lymphozyten exprimierte CD8 und scheint dem Gedächtnistyp oder dem immunsuppressorischen Lymphozytentyp anzugehören. Nur ein kleiner Teil der Lymphozyten ist durch CD20 gekennzeichnet und gehören damit zur B-Zell-Reihe.

Die Verteilung der Lymphozyten entlang des Rückenmarks sowie in verschiedenen Regionen (bzw. grauer/weißer Substanz) schien am ehesten zufällig und unabhängig von der Lage bezüglich Gefäßen (perivaskuläre Lage bzw. intraparenchymatöse Lage) oder funktionellen Strukturen zu sein.

Erhöhte Lymphozytenzahlen wurden für weibliche Personen in hohem Alter mit entzündlichen Allgemeinerkrankungen festgestellt.

Die Dominanz der CD8-Lymphozyten lässt auf einen spezifischen Eintritts- und/oder Überlebensvorteil für CD8-Zellen im ZNS-Gewebe schließen. Die genaue Funktion der CD8-Zellen im Rückenmarksgewebe ist jedoch nach wie vor nicht bekannt. Da jedoch CD25 als Aktivierungsmarker kaum positive Ergebnisse zeigte, scheint der Großteil der CD8-Zellen nicht aktiviert zu sein. Die festgestellte Abwesenheit von Granzym und Perforin lässt weiterhin folgern, dass die gefundenen T-Zellen nicht aktivierten zytotoxischen T-Zellen oder NK-Zellen entsprechen, obgleich sich ein verschwindend geringer Teil der Lymphozyten positiv für CD57 darstellt, einem Marker der auf Zellen der natürlichen Killerzellpopulation zu finden ist.

Die weitere Erforschung der dominanten CD8-Population im menschlichen Rückenmark, die bis jetzt keiner T-Zell-Population eindeutig zugeordnet werden konnte, kann zum besseren Verständnis der Immunüberwachung im ZNS entscheidend beitragen. Eine Rolle dieser CD8-Population in der Induktion und Aufrechterhaltung des Immunprivilegs erscheint möglich.

Wie sich bereits in exemplarischen CD4-Färbungen gezeigt hatte, konnte die Abwesenheit einer relevanten Population von CD4 Zellen im menschlichen Rückenmark indirekt dadurch bestätigt werden, dass der Gesamt-T-Zell-Marker CD3 keine signifikant höheren Zellzahlen ergab als die Auswertung der CD8 Zellen.

Bibliographie

1. Abbott NJ, 2002. *Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability*. J Anat. 2002 Jun; 200(6):629-38.
2. Adamson P, Etienne S, Couraud PO, Calder V, Greenwood J, 1999. *Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signalling through endothelial ICAM-1 via a Rho-dependent pathway*. J Immunol, 162: 2964-2973.
3. Adamson P, Wilbourn B, Etienne-Manneville S, Calder V, Beraud E, Milligan G, Couraud PO, Greenwood J, 2002. *Lymphocyte trafficking through the blood-brain barrier is dependent on endothelial cell heterotrimeric G-protein signalling*. FASEB J, 16(10):1185-94.
4. Aloisi F, 2001. *Immune function of microglia*. Glia. 2001 Nov;36(2):165-79.
5. Alter A, Duddy M, Hebert S, Biernacki K, Prat A, Antel JP, Yong VW, Nuttall RK, Pennington CJ, Edwards DR, Bar-Or A, 2003. *Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells*. J Immunol. 2003 May 1; 170(9):4497-505.
6. Anthony IC, Crawford DH, Bell JE, 2003. *B lymphocytes in the normal brain: contrasts with HIV-associated lymphoid infiltrates and lymphomas*. Brain. 2003 May; 126(Pt 5):1058-67.
7. Asensio VC und Campbell IL, 1999. *Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states*. Trends Neurosci. 1999 Nov; 22(11):504-12.
8. Aspinall R, 2003. *Age-related changes in the function of T cells*. Microsc Res Tech. 2003 Dec 15; 62(6):508-13.
9. Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Lamagna C, Ozaki H, Kita T, Imhof BA, 2002. *Junctional adhesion molecules and interendothelial junctions*. Cells Tissues Organs. 2002; 172(3):152-60.
10. Bade B, Boettcher HE, Lohrmann J, Hink-Schauer C, Bratke K, Jenne DE, Virchow JC Jr, Luttmann W, 2005. *Differential expression of the granzymes A, K and M and perforin in human peripheral blood lymphocytes*. Int Immunol. 2005 Nov; 17(11):1419-28. Epub 2005 Sep 26
11. Banisadr G, Rostène W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM, 2005. *Chemokines and brain functions*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005 Jun; 4(3):387-99.

12. Barber EK, Dasgupta JD, Schlossman SF, Trevillyan JM, Rudd CE, 1989. *The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 May; 86(9):3277-81.
13. Barker CF und Billingham RE, 1977. *Immunological privileged sites*. Adv Immunol 25:1-54.
14. Bauer J, Bradl M, Hickley WF, Forss-Petter S, Breitschopf H, Linington C, Wekerle H, Lassmann H, 1998. *T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition*. Am J Pathol. 1998 Sep; 153(3):715-24.
15. Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F, 1999. *FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier*. Glia. 1999 Jul; 27(1):62-74.
16. Bechmann I, Priller J, Kovac A, Böntert M, Wehner T, Klett FF, Bohsung J, Stuschke M, Dirnagl U, Nitsch R, 2001. *Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages*. Eur J Neurosci. 2001 Nov; 14(10):1651-8.
17. Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simbürger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J, 2005. *Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia*. FASEB J. 2005 Apr; 19(6):647-9. Epub 2005 Jan 25.
18. Bevan MJ, 2004. *Helping the CD8(+) T-cell response*. Nat Rev Immunol. 2004 Aug; 4(8):595-602.
19. Bieber AJ, Kerr S, Rodriguez M, 2003. *Efficient central nervous system remyelination requires T cells*. Ann Neurol. 2003 May; 53(5):680-4.
20. Billingham RE und Boswell T, 1953. *Studies on the problem of corneal homografts*. Proc R soc Lond B Biol Sci 141: 392-406.
21. Blom B und Spits H, 2006. *Development of human lymphoid cells*. Annu Rev Immunol. 2006; 24:287-320.
22. Boettcher HE, 2005. *Die Bedeutung von Granzym A, B, K und Perforin bei gesunden Personen und in der Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen*. Epub: <http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/2476/>

23. Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Hay J, Johnston M, 1998. *Determination of volumetric cerebrospinal fluid absorption in to extracranial lymphatics in sheep.* Am J Physiol 274: 88-96.
24. Bouras C, Riederer BM, Kövari E, Hof PR, Giannakopoulos P, 2005. *Humoral immunity in brain aging and Alzheimer's disease.* Brain Res Brain Res Rev. 2005 Jun; 48(3):477-87. Epub 2004 Oct 28.
25. Bradbury MWB und Cole DF, 1980. *The role of the lymphatic system in drainage of cerebrospinal fluid and aqueous humor.* J Physiol 299: 353-365.
26. Bradbury MWB und Westrop RJ, 1983. *Factors influencing exit of substances from cerebrospinal fluid into the blood-brain barrier.* Elsevier, New York, pp 383-402.
27. Bradl M und Flügel A, 2002. *The role of T cells in brain pathology.* Curr Top Microbiol Immunol. 2002; 265:141-62.
28. Bradl M, Bauer J, Flügel A, Wekerle H, Lassmann H, 2005. *Complementary contribution of CD4 and CD8 T lymphocytes to T-cell infiltration of the intact and the degenerative spinal cord.* Am J Pathol. 2005 May; 166(5):1441-50.
29. Bratke K, Kuepper M, Bade B, Virchow JC Jr, Luttmann W, 2005. *Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8+ T cell differentiation in peripheral blood.* Eur J Immunol. 2005 Sep; 35(9):2608-16.
30. Byrnes AP, MacLaren RE, Charlton HM, 1996. *Immunological instability of persistent adenovirus vectors in the brain: peripheral exposure to vector leads to renewed inflammation, reduced gene expression, and demyelination.* J Neurosci. 1996 May 1; 16(9):3045-55.
31. Cabarrocas J, Bauer J, Piaggio E, Liblau R, Lassmann H, 2003. *Effective and selective immune surveillance of the brain by MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes.* Eur J Immunol. 2003 May; 33(5):1174-82.
32. Carrithers MD, Visintin I, Kang SJ, Janeway CA Jr, 2000. *Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment.* Brain. 2000 Jun; 123 (Pt 6):1092-101.
33. Chavarria A und Alcocer-Varela J, 2004. *Is damage in central nervous system due to inflammation?* Autoimmun Rev. 2004 Jun; 3(4):251-60.

34. Cobbold SP, Adams E, Graca L, Daley S, Yates S, Paterson A, Robertson NJ, Nolan KF, Fairchild PJ, Waldmann H., 2006. *Immune privilege induced by regulatory T cells in transplantation tolerance*. Immunol Rev. 2006 Oct; 213:239-55.
35. Comi C, Gaviani P, Leone M, Ferretti M, Castelli L, Mesturini R, Ubezio G, Chiocchetti A, Osio M, Muscia F, Bogliun G, Corso G, Gavazzi A, Mariani C, Cantello R, Monaco F, Dianzani U, 2006. *Fas-mediated T-cell apoptosis is impaired in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. J Peripher Nerv Syst. 2006 Mar;11(1):53-60
36. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA, 2001. *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol. 2001 Nov; 22(11):633-40.
37. Cornford EM und Hyman S, 1999. *Blood-brain barrier permeability to small and large molecules*. Adv Drug Deliv Rev. 1999 Apr 5; 36(2-3):145-163.
38. Correale J und Villa A, 2008. *Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol. 2008 Mar; 195(1-2):121-34. Epub 2008 Jan 30.
39. Cosmi L, Liotta F, Angeli R, Mazzinghi B, Santarlaschi V, Manetti R, Lasagni L, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Annunziato F, Romagnani S, 2004. *Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25+ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokines*. Blood. 2004 Apr 15; 103(8):3117-21. Epub 2003 Dec 24.
40. Craigie EH, 1920. *On the relative vascularity of various parts of the central nervous system of the albino rat*. J Comp Neurol 31:429-464.
41. Cserr HF, Harling-Berg CJ, Knopf PM, 1992. Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. Brain Pahtol 2:269-276.
42. Cserr HF und Knopf PM, 1992. *Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view*. Immunol Today. 1992 Dec; 13(12):507-12.
43. Daniels MA und Jameson SC, 2000. *Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers*. J Exp Med. 2000 Jan 17; 191(2):335-46.
44. Dietzschold B und Richt JA (eds.), 2002. *Protective and pathological immune response in the CNS*. Springer Verlag.

45. Dong Y und Benveniste EN, 2001. *Immune function of astrocytes*. *Glia*. 2001 Nov; 36(2):180-90.
46. Ehrlich P, 1885. *Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus: eine farbenanalytische Studie*. Berlin, Hirschwald.
47. Engelhardt JI, Tajti J, Appel SH, 1993. *Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis*, *Arch Neurol*. 1993 Jan; 50(1):30-6.
48. Engelhardt B und Ransohoff RM, 2005. *The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms*. *Trends Immunol* 26:485-495.
49. Engelhardt B, 2006. *Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier*. *J Neural Transm*. 2006 Apr; 113(4):477-85.
50. Engelhardt B und Wolburg H, 2004. Mini-review: *Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* *Eur J Immunol*. 2004 Nov; 34(11):2955-63.
51. Fabry Z, Raine CS, Hart MN, 1994. *Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS*. *Immunol Today*. 1994 May; 15(5):218-24.
52. Farag SS und Caligiuri MA, 2006. *Human natural killer cell development and biology*. *Blood Rev*. 2006 May; 20(3):123-37. Epub 2005 Dec 20.
53. Filaci G, Fravega M, Fenoglio D, Rizzi M, Negrini S, Viggiani R, Indiveri F, 2004. *Non-antigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes*. *Clin Exp Med*. 2004 Oct; 4(2):86-92.
54. Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, Kunz-Schughart L, Schmidt CA, Andreesen R, Mackensen A, 2005. *Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells*. *Blood*. 2005 Apr 1; 105(7):2828-35. Epub 2004 Nov 30.
55. Fleisher TA und Oliveira JB, 2004. *Functional and molecular evaluation of lymphocytes*. *J Allergy Clin Immunol*, 114(2):227-34; quiz 235.
56. Flügel A, Schwaiger FW, Neumann H, Medana I, Willem M, Wekerle H, Kreutzberg GW, Graeber MB, 2000. *Neuronal FasL induces*

- cell death of encephalitogenic T lymphocytes.* Brain Pathol. 2000 Jul; 10(3):353-64.
57. Fontana A, Fierz W, Wekerle H, 1984. *Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines.* Nature. 1984 Jan. 19-25;307(5948):273-6.
58. Ford AL, Foulcher E, Lemckert FA, Sedgwick JD, 1996. *Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death.* J Exp Med. 1996 Nov 1; 184(5):1737-45.
59. Foster K, Carrabis S, Morrill R, Meisner P, Litwak G, Fonte J, Czerniewsz MA, Landay A, 1996. *The effect of antigen density, soluble CD8, and CD8+ NK cell contribution on the TRAx CD8 assay.* Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Program Abstr 3rd Conf Retrovir Oppor Infect Conf Retrovir Oppor Infect 3rd 1996 Wash D C. 1996 Jan 28-Feb 1; 3rd: 136. T Cell Diagnostics, Inc., Woburn, MA.
60. Freud AG und Caligiuri MA, 2006. *Human natural killer cell development.* Immunol Rev. 2006 Dec; 214:56-72.
61. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S, 1993. *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions.* J Cell Biol. 1993 Dec; 123(6 Pt 2):1777-88.
62. Galea I, Bechmann I, Perry VH, 2007. *What is immune privilege (not)?* Trends Immunol. 2007 Jan; 28(1):12-8. Epub 2006 Nov 28.
63. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, Narni-Mancinelli E, Lauvau G, 2008. *Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses.* Immunol Cell Biol. 2008 Jul; 86(5):398-408. Epub 2008 Apr 8.
64. Gell PGH und Coombs RRA, 1968. *Clinical aspects of immunology.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1968 p.354.
65. Gold R, Linker RA, Chan A, 2007. *Termination of inflammation in the nervous system.* Rev Neurol (Paris). 2007 Jun; 163(6-7):672-6.
66. Goldmann E, 1909. *Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Licht der vitalen Färbung.* Beitr Klein Chir 64:192-265.
67. Goldmann J, Kwidzinski E, Brandt C, Mahlo J, Richter D, Bechmann I, 2006. *T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa.* J Leukoc Biol. 2006 Oct;80(4):797-801. Epub 2006 Aug 2.

68. Graeber MB und Streit WJ, 1990. *Microglia: immune network in the CNS*. Brain Pathol. 1990 Sep; 1(1):2-5.
69. Green DR, Droin N, Pinkoski M, 2003. *Activation-induced cell death in T cells*. Immunol Rev. 2003 Jun; 193:70-81.
70. Greenwood J und Calder VL, 1993. *Lymphocyte migration through cultured endothelial cell monolayers derived from the blood-retinal barrier*. Immunology. 1993 Nov; 80(3):401-6.
71. Harling-Berg CJ, Hallett JJ, Park JT, Knopf PM, 2002. *Hierarchy of immune responses to antigen in the normal brain*. in Protective and pathological immune responses in the CNS, Dietschold B, Richt JA (eds). Springer Verlag, 1-22.
72. Harling-Berg CJ, Park JT, Knopf OM, 1999. *Role of the cervical lymphatics in the Th2 type hierarchy of CNS immune regulation*. 1: J Neuroimmunol. 1999 Nov 15; 101(2):111-27.
73. Harling-Berg CJ, Knopf PM, Merriam J, Cserr HF, 1989. *Role of the cervical lymph nodes in the systemic humoral immune response to human serum albumin microinfused into rat cerebrospinal fluid*. J Neuroimmunol 25: 185-193
74. Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H, 2005. *In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro*. Cell Mol Neurobiol. 2005 Feb; 25(1):25-39.
75. Hatterer E, Davoust N, Didier-Bazes M, Vuaillet C, Malcus C, Belin MF, Nataf S, 2006. *How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes*. Blood 107:806-812.
76. Hawke S, Stevenson PG, Freeman S, Bangham CR, 1998. *Long-term persistence of activated cytotoxic T lymphocytes after viral infection of the central nervous system*. J Exp Med. 1998 May 18; 187(10):1575-82.
77. Hawkins BT und Egleton RD, 2008. *Pathophysiology of the blood-brain barrier: animal models and methods*. Curr Top Dev Biol. 2008; 80:277-309.
78. Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, Yamamoto H, 1997. *Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes*. Glia. 1997 Jan; 19(1):13-26.

79. Hayes GM, Woodroffe MN, Cuzner ML, 1987. *Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter*. J Neurol Sci 1987 Aug; 80(1):25-37.
80. Hickey WF, 2001. *Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system*. Glia. 2001 Nov;36(2):118-24.
81. Hickey WF, 1999. *Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles*. Semin Immunol. 1999 Apr; 11(2):125-37.
82. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H, 1991. *T-lymphocyte entry into the central nervous system*. J Neurosci Res, 28: 254.
83. Hickey WF und Kimura H, 1987. *Graft-vs.-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Apr; 84(7):2082-6.
84. Hochmeister S, Zeitelhofer M, Bauer J, Nicolussi EM, Fischer MT, Heinke B, Selzer E, Lassmann H, Bradl M, 2008. *After injection into the striatum, in vitro-differentiated microglia- and bone marrow-derived dendritic cells can leave the central nervous system via the blood stream*. Am J Pathol. 2008 Dec; 173(6):1669-81. Epub 2008 Oct 30.
85. Homann D, Teyton L, Oldstone MB, 2001. *Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell Gedächtnis*. Nat Med. 2001 Aug; 7(8):913-9.
86. Hsu SM, Raine L, Fanger H, 1981. *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures*. J Histochem Cytochem 29: 577-580.
87. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, 2005. *Immunobiology*. 6. Edition, Garland Science Publishing, Oxon, UK.
88. Jander S, Schroeter M, D'Urso D, Gillen C, Witte OW, Stoll G, 1998. *Focal ischaemia of the rat brain elicits an unusual inflammatory response: early appearance of CD8+ macrophages/microglia*. Eur J Neurosci. 1998 Feb;10(2):680-8
89. Jiang H, Zhang SI, Pernis B, 1992. *Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis*. Science. 1992 May 22; 256(5060):1213-5.

90. Jiang H und Chess L., 2004. *An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation.* J Clin Invest. 2004 Nov; 114(9):1198-208.
91. Johnson AJ, Suidan GL, McDole J, Pirko I, 2007. *The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology?* Int Rev Neurobiol. 2007; 79:73-97.
92. Johnston B, Chee A, Issekutz TB, Ugarova T, Fox-Robichaud A, Hickey MJ, Kubes P, 2000. *Alpha 4 integrin-dependent leukocyte recruitment does not require VCAM-1 in a chronic model of inflammation.* J Immunol., 169(2): 1000-6
93. Kapp JA und Bucy RP, 2008. *CD8+ suppressor T cells resurrected.* Hum Immunol. 2008 Nov;69(11):715-20. Epub 2008 Sep 24.
94. Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z, 2004. *Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells.* J Immunol, 2004, 173: 2353-2361.
95. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R, 1999. *Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?* J Exp Med. 1999 Mar 1;189(5):865-70
96. Kida S, Weller RO, Zhang E-T, Phillips MJ, Iannotti F, 1995. *Anatomical pathways for lymphatic drainage of the brain and their pathological significance.* Neuropathol Appl Neurobiol 21:181-184.
97. Kim JH, Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW, 2006. *Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface.* J Biochem Mol Biol. 2006 Jul 31; 39(4):339-45.
98. Kim SU und de Vellis J, 2005. *Microglia in health and disease.* J Neurosci Res. 2005 Aug 1; 81(3):302-13.
99. Kivisäkk P, Mahad DJ, Callahan MK, Trebst C, Tucky B, Wei T, Wu L, Baekkevold ES, Lassmann H, Staugaitis SM, Campbell JJ, Ransohoff RM, 2003. *Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8; 100(14):8389-94. Epub 2003 Jun 26.
100. Kleine TO und Benes L, 2006. *Immune surveillance of the human Central Nervous System (CNS): Different migration pathways of immune*

- cells through the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in healthy persons.* Cytometry Part A69A: 147-151.
101. Knopf PM, Cserr HF, Nolan SC, Wu T-Y, Harling-Berg CJ, 1995. *Physiology and immunology of lymphatic drainage of interstitial and cerebrospinal fluid from the brain.* Neuropathol Appl Neurobiol 21: 175-180.
 102. Kruse J, Mailhammer R, Wernecke H, Faissner A, Sommer I, Goridis C, Schachner M, 1984. Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature.* 1984;311:153-5.
 103. Kwidzinski E, Mutlu LK, Kovac AD, Bunse J, Goldmann J, Mahlo J, Aktas O, Zipp F, Kamradt T, Nitsch R, Bechmann I, 2003. *Self-tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model.* J Neural Transm Suppl. 2003; (65):29-49.
 104. Law CL, Hayden-Ledbetter M, Buckwalter S, McNeill L, Nguyen H, Habecker P, Thorne BA, Dua R, Ledbetter JA, 2002. *Expression and characterization of recombinant soluble human CD3 molecules: presentation of antigenic epitopes defined on the native TCR-CD3 complex.* Int Immunol. 2002 Apr; 14(4):389-400.
 105. Lawson LJ, Perry VH, Gordon S, 1992. *Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain.* Neuroscience 1992; 48(2): 405-415.
 106. Lees JR, Archambault AS, Russell JH, 2006. *T-cell trafficking competence is required for CNS invasion.* J Neuroimmunol. 2006 Aug; 177(1-2):1-10. Epub 2006 Jul 5.
 107. Liu Y, Teige I, Birnir B, Issazadeh-Navikas S, 2006. *Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE.* Nat Med. 2006 May; 12(5):518-25. Epub 2006 Apr 23.
 108. MacLennan IC, 1994. *Germinal centers.* Annu. Rev. Immunol. 1994; 12:117.
 109. Magnus T, Schreiner B, Korn T, Jack C, Guo H, Antel J, Ifergan I, Chen L, Bischof F, Bar-Or A, Wiendl H, 2005. *Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS.* J Neurosci. 2005 Mar 9; 25(10):2537-46.
 110. Man S, Ubogu EE, Williams KA, Tucky B, Callahan MK, Ransohoff RM, 2008. *Human brain microvascular endothelial cells and*

- umbilical vein endothelial cells differentially facilitate leukocyte recruitment and utilize chemokines for T cell migration.* Clin Dev Immunol. 2008; 2008:384982.
111. Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM, 2007. *Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale.* Brain Pathol. 2007 Apr; 17(2):243-50. Review.
112. Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, Marboe C, Mancini D, Cortesini R, Suci-Foca N, 2004. *Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity.* Int Immunol. 2004 Aug; 16(8):1055-68. Epub 2004 Jun 28.
113. Masopust D, Vezys V, Usherwood EJ, Cauley LS, Olson S, Marzo AL, Ward RL, Woodland DL, Lefrançois L, 2004. *Activated primary and Gedächtnis CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin.* J Immunol. 2004 Apr 15; 172(8):4875-82.
114. Matyszak MK und Perry VH, 1995. *Demyelination in the central nervous system following a delayed-type hypersensitivity response to bacillus Calmette-Guérin.* Neuroscience. 1995 Feb; 64(4):967-77.
115. McMEnamin PG, Wealthall RJ, Deverall M, Cooper SJ, Griffin B, 2003. *Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy.* Cell Tissue Res 313:259-269.
116. McPherson SW, Heuss ND, Roehrich H, Gregerson DS, 2006. *Bystander killing of neurons by cytotoxic T cells specific for a glial antigen.* Glia. 2006 Apr 1; 53(5):457-66.
117. Medawar PB, 1948. *Immunity to homologous grafted skin. III. Fate of skin homografts transplanted to different functional properties.* Annu Rev Immunol 7: 145-173.
118. Meinl E, Aloisi F, Ertl B, Weber F, de Waal Malefyt R, Wekerle H, Hohlfeld R, 1994. *Multiple sclerosis. Immunomodulatory effects of human astrocytes on T cells.* Brain. 1994 Dec; 117 (Pt 6):1323-32.
119. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R, 2001. *Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude.* Acta Neuropathol (Berl). 2001 Mar; 101(3):249-55.

120. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S, 1999. *Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells*. J Cell Biol. 1999 Oct 4; 147(1):185-94.
121. van der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R, 2003. Prolonged presence of effector-Gedächtnis CD8 T cells in the central nervous system after dengue virus encephalitis. Int Immunol. 2003 Jan; 15(1):119-25.
122. Mrass P und Weninger W, 2006. *Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors*. Immunol Rev. 2006 Oct; 213:195-212.
123. Murphy JB und Sturm E, 1923. *Conditions determining the transplantability of tissues in the brain*. J Exp Med 38:183-197.
124. Nadler LM, Korsmeyer SJ, Anderson KC, Boyd AW, Slaughenhaupt B, Park E, Jensen J, Coral F, Mayer RJ, Sallan SE, 1984. *B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation*. J Clin Invest. 1984 Aug; 74(2):332-40.
125. Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, Clarkson MR, Sayegh MH, Khoury SJ, 2003. *Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model*. J Clin Invest. 2003 Oct; 112(7):1037-48.
126. Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H, 2002. *Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases*. Trends Neurosci. 2002 Jun; 25(6):313-9.
127. Noble A, Giorgini A, Leggat JA, 2006. *Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage*. Blood. 2006 Jun 1; 107(11):4475-83. Epub 2006 Feb 7.
128. Oehmichen M, 1978. *Mononuclear phagocytes in the central nervous system*. Springer, New York, pp 65-87.
129. Ohkawa T, Seki S, Dobashi H, Koike Y, Habu Y, Ami K, Hiraide H, Sekine I, 2001. *Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells*. Immunology. 2001 Jul; 103(3):281-90.
130. Olson DP, Dombkowski DM, Kelliher AS, Pontillo C, Anderson DC, Preffer FI, 2004. *Differential expression of cell surface antigens on subsets of CD4+ and CD8+ T cells*. Med Sci Monit. 2004 Sep; 10(9):BR339-45. Epub 2004 Aug 20.

131. O'Shea JJ und Ortaldo JR, 1990. *Killer T's, macrophages, and NK's. The Fourth International Cell-Mediated Cytotoxicity Workshop, sponsored by the Pittsburgh Cancer Institute, and the University of Pittsburgh Medical Health Care Division, Oglebay Park, WV, USA, June 10-13, 1990.* New Biol. 1990 Sep; 2(9):779-82.
132. Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schröder A, Weber C, 2002. *JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes.* Nat Immunol. 2002 Feb; 3(2):151-8. Epub 2002 Jan 14.
133. Pardridge WM, 1999. *Blood-brain barrier biology and methodology.* J Neurovirol. 1999 Dec; 5(6):556-69.
134. Pardridge WM, 2007. *Drug targeting to the brain.* Pharm Res. 2007 Sep; 24(9):1733-44. Epub 2007 Jun 7.
135. Perry VH, 1998. *A revised view of central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation.* J. Neuroimmunol, 90, 113-121.
136. Perry VH und Gordon S, 1987. *Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain.* J Exp Med. 1987 Oct 1; 166(4):1138-43.
137. Phillips LM und Lampson LA, 1999. *Site-specific control of T cell traffic in the brain: T cell entry to brainstem vs. hippocampus after local injection of IFN-gamma.* J Neuroimmunol. 1999 May 3; 96(2):218-27.
138. Piccio L, Rossi B, Scarpini E, Laudanna C, Giagulli C, Issekutz AC, Vestbweber D, Butcher EC, Constantin G, 2002. *Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors.* J Immunol, 168 (4): 1940-9.
139. Popovich PG, van Rooijen N, Hickey WF, Preidis G, McGaughy V, 2003. *Hematogenous macrophages express CD8 and distribute to regions of lesion cavitation after spinal cord injury.* Exp Neurol. 2003 Aug;182(2):275-87
140. Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagel U, 2001. *Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment.* Nat Med 2001; 7(12): 1356-1361.

141. Pryce G, Male DK, Campbell I, Greenwood J, 1997. *Factors controlling T-cell migration across rat cerebral endothelium in vitro*. J Neuroimmunol, 75: 84.
142. Qing Z, Sewell D, Sandor M, Fabry Z, 2000. *Antigen-specific T cell trafficking into the central nervous system*. J Neuroimmunol. 2000 Jun 26; 105(2):169-78.
143. Ransohoff RM, 2007. *“Doing the locomotion”: new moves for the multi-step paradigm for leukocyte extravasation*. Blood 109:1342-1343.
144. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G, 2003. *Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system*. Nat Rev Immunol. 2003 Jul; 3(7):569-81.
145. Reese TS und Karnovsky MJ, 1967. *Fine structural localization of blood brain barrier to exogenous peroxidase*. J Cell Biol 34: 207-217.
146. Reinherz EL und Schlossman SF, 1980. *The differentiation and function of human T lymphocytes*. Cell. 1980 Apr; 19(4):821-7.
147. Risau W, Esser S, Engelhardt B, 1998. *Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells*. Pathol Biol (Paris). 1998 Mar;46(3):171-5
148. Risau W und Wolburg H, 1990. *Development of the blood-brain barrier*. Trends Neurosci. 1990 May; 13(5):174-8.
149. Rosche B, Kieseier B, Hartung HP, Hemmer B, 2003. *New understanding of the immunopathogenesis of multiple sclerosis*. Nervenarzt. 2003 Aug;74(8):654-63.
150. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A, 2004. *Central Gedächtnis and effector Gedächtnis T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol. 2004; 22:745-63.
151. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A, 1999. *Two subsets of Gedächtnis T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature. 1999 Oct 14; 401(6754):708-12.
152. Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H, 2004. *Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells*. J Clin Invest. 2004 Nov; 114(9):1218-21.
153. Sasaki N, Higashi N, Taka T, Nakajima M, Irimura T, 2004. *Cell surface localization of heparanase on macrophages regulates degradation of extracellular matrix heparan sulfate*. J Immunol. 2004 Mar 15; 172(6):3830-5.

154. Scheinberg LC, Kotsilimbas DG, Karpf R, Mayer N, 1966. *Is the brain „an immunologically privileged site“?* Arch Neurol 15: 62-67.
155. Scheld WM, 1989. *Drug delivery to the central nervous system: general principles and relevance to therapy for infections of the central nervous system.* Rev Infect Dis. 1989 Nov-Dec; 11 Suppl 7:S1669-90.
156. Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA, 2004. *Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation.* Nat Immunol. 2004 Apr; 5(4):393-400. Epub 2004 Mar 14.
157. Schroeter M, Stoll G, Weissert R, Hartung HP, Lassmann H, Jander S, 2003. *CD8+ phagocyte recruitment in rat experimental autoimmune encephalomyelitis: association with inflammatory tissue destruction.* Am J Pathol. 2003 Oct; 163(4):1517-24.
158. Seder RA und Ahmed R, 2003. *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and Gedächtnis T cell generation.* Nat Immunol. 2003 Sep;4(9):835-42.
159. Shirai Y, 1921. *On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogeneous animals.* Jpn Med World I: 15.
160. Smith TR und Kumar V, 2008. *Revival of CD8(+) Treg-mediated suppression.* Trends Immunol. 2008 May 29. [Epub ahead of print]
161. Springer TA, 1994. *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.* Cell 76: 301.
162. Stevenson PG, Hawke S, Sloan DJ, Bangham CR, 1997. *The immunogenicity of intracerebral virus infection depends on anatomical site.* J Virol. 1997 Jan; 71(1):145-51.
163. Stoll M, Capper D, Dietz K, Warth A, Schleich A, Schlaszus H, Meyermann R, Mittelbronn M, 2006. *Differential microglial regulation in the human spinal cord under normal and pathological conditions.* Neuropathol Appl Neurobiol. 2006 Dec; 32(6):650-61.
164. Streilein JW, 1995. *Unraveling immune privilege.* Science. 1995 Nov 17; 270(5239):1158-9.
165. Strober S, Dejbachsh-Jones S, Van Vlasselaer P, Duwe G, Salimi S, Allison JP, 1989. *Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor.* J Immunol. 1989 Aug 15; 143(4):1118-22.

166. Svenningsson A, Andersen O, Edsbagge M, Stemme S, 1995. *Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid*. J Neuroimmunol. 1995 Dec; 63(1):39-46.
167. Takata H und Takiguchi M, 2006. *Three Gedächtnis subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules*. J Immunol. 2006 Oct 1; 177(7):4330-40.
168. Tan KH, Purcell WM, Heales SJR, McLeod JD, Hurst RD, 2002. *Activated T cells mediate direct blood-brain barrier endothelial cell death and dysfunction*. Membrane Biophysics und Biochemistry 2002 Dec; 13(18):2587-91.
169. Tang XL, Smith TR, Kumar V, 2005. *Specific control of immunity by regulatory CD8 T cells*. Cell Mol Immunol. 2005 Feb; 2(1):11-9.
170. Tarazona R, Dela Rosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Peña J, Solana R, 2000. *Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells*. Mech Ageing Dev. 2000 Dec 20; 121(1-3):77-88.
171. Tedder TF und Engel P, 1994. *CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes*. Immunol Today. 1994 Sep; 15(9):450-4.
172. Thomas WE, 1999. *Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells*. Brain Res Brain Res Rev. 1999 Dec; 31(1):42-57.
173. Tomlinson GS, Simmonds P, Busuttill A, Chiswick A, Bell JE, 1999. *Upregulation of microglia in drug users with and without pre-symptomatic HIV infection*. Neuropathol Appl Neurobiol. 1999 Oct; 25(5):369-79.
174. Trajkovic V, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Miljkovic D, Popadic D, Markovic M, Bumbasirevic V, Backovic A, Cvetkovic I, Harhaji L, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M, 2004. *Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity*. Glia. 2004 Aug 1; 47(2):168-79.
175. Trapani JA und Smyth MJ, 2002. *Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway*. Nat Rev Immunol. 2002 Oct; 2(10):735-47.
176. Tsoukas CD, Valentine M, Lotz M, Vaughan JH, Carson DA, 1985. *The role of the T3 molecular complex on human T lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Adv Exp Med Biol. 1985; 184:365-85.
177. Ulvestad E, Williams K, Bjerkvig R, Tiekotter K, Antel J, Matre R, 1994. *Human microglial cells have phenotypic and functional*

- characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells.* J Leukoc Biol. 1994 Dec; 56(6):732-40.
178. Universität Düsseldorf. Accessed 28.05.2008. *Menschliches Rückenmark.*
www.uniduesseldorf.de/MedFak/mai/2004/content/neuroanatomie/theme n/Na_Q/img/Q06_01ab-1.jpg&imgrefurl.
179. Vass K und Lassmann H, 1990. *Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system.* Am J Pathol 137:789-800.
180. Vajkoczy P, Laschinger M, Engelhardt B, 2001. *Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels.* J Clin Invest. 2001 Aug; 108(4):557-65.
181. Villoslada P, Hauser SL, Bartke I, Unger J, Heald N, Rosenberg D, Cheung SW, Mobley WC, Fisher S, Genain CP, 2000. *Human nerve growth factor protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance of T helper cell type 1 and 2 cytokines within the central nervous system.* J Exp Med. 2000 May 15; 191(10):1799-806.
182. Vrethem M, Dahle C, Ekerfelt C, Forsberg P, Danielsson O, Ernerudh J, 1998. *CD4 and CD8 lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with multiple sclerosis, meningitis and normal controls.* Acta Neurol Scand. 1998 Apr; 97(4):215-20.
183. Walter BA, Valera VA, Takahashi S, Matsuno K, Ushiki T, 2006. *Evidence of antibody production in the rat cervical lymph nodes after antigen administration into the cerebrospinal fluid.* Archives of Histology and Cytology, 2006; 69 (1):37-47.
184. Weiss HR, Buchweitz E, Murtha TJ, Auletta M, 1982. *Quantitative regional determination of morphometric indices of the total and perfused capillary network in the rat brain.* Circ Res 51:494-503.
185. Wekerle H, 2002. *Immune protection of the brain--efficient and delicate.* J Infect Dis. 2002 Dec 1; 186 Suppl 2:S140-4.
186. Wekerle H, 1994. *Antigen presentation by CNS glia.* In: Kettenmann H, Ransom B (eds). *Neuroglial cells.* Oxford University Press, Oxford UK.
187. Wekerle H, Engelhardt B, Risau W, Meyermann R, 1991. *Interaction of T lymphocytes with cerebral endothelial cells in vitro.* Brain Pathol. 1991 Jan;1(2):107-14.

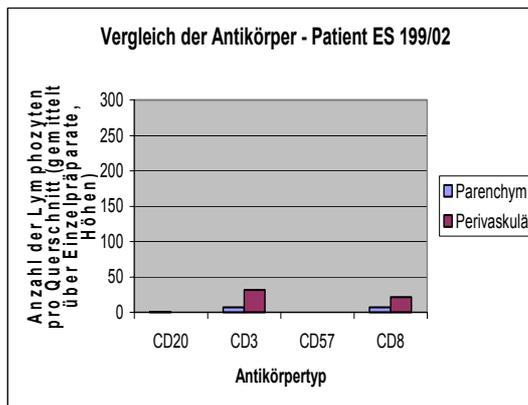
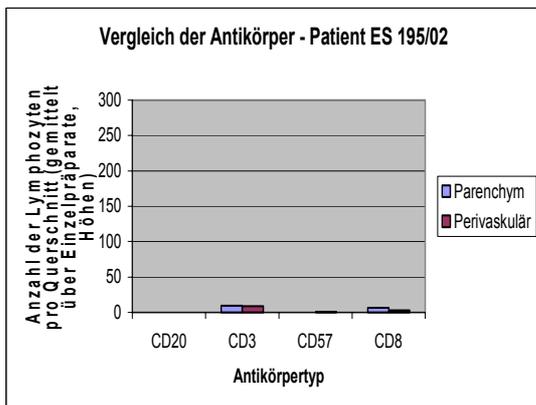
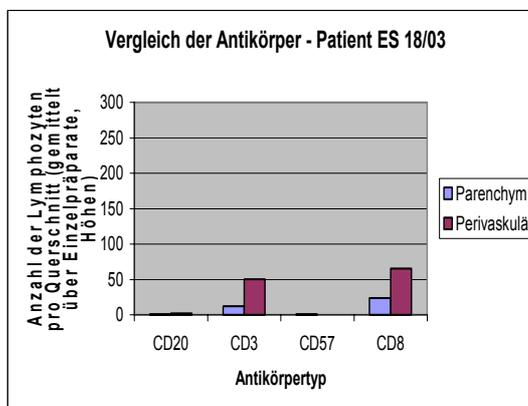
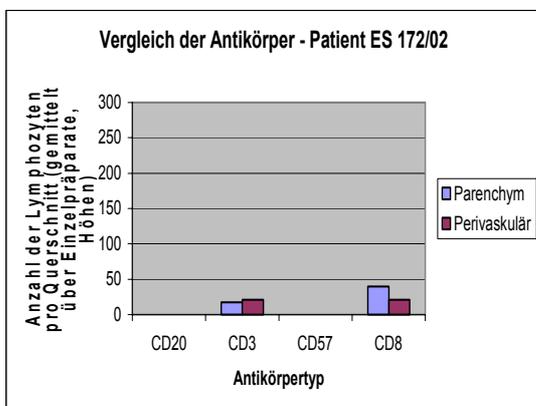
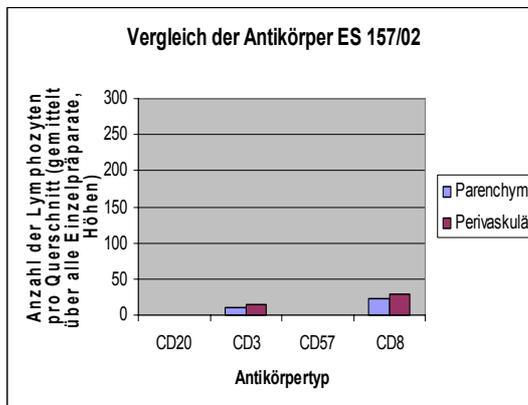
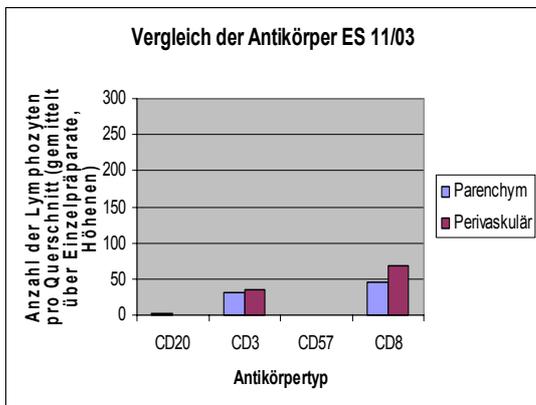
188. Wekerle H, Sun D, Oropeza-Wekerle RL, Meyermann R, 1987. *Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells*. J Exp Biol. 1987 Sep; 132:43-57.
189. Weller RO, Galea I, Carare RO, Minagar A, 2009. *Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis*. Pathophysiology. 2009 Nov 30.
190. Weller RO, Kida S, Zhang E-T, 1992. *Pathways of fluid drainage from the brain: morphological aspects and immunological significance*. Brain Pathol 2:227-284.
191. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH, 2001. *Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts*. Lab Invest. 2001 Mar; 81(3):263-81.
192. Whiteside TL und Herberman RB, 1994. *Role of human natural killer cells in health and disease*. Clin Diagn Lab Immunol. 1994 Mar; 1(2):125-33.
193. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Engelhardt B, 2004. *Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalitis leaves tight junctions intact*. Acta neuropathol, 109 (2): 181-190. Epub Nov 2004.
194. Yamada S, DePasquale M, Patlak CS, Cserr HF, 1991. *Albumin outflow into deep cervical lymph from different regions of rabbit brain*. Am J Physiol 261 (Heart Circ Physiol 30): H1197-H1204.
195. Yeager MP, DeLeo JA, Hoopes PJ, Hartov A, Hildebrandt L, Hickey WF, 2000. *Trauma and inflammation modulate lymphocyte localization in vivo: quantitation of tissue entry and retention using indium-111-labeled lymphocytes*. Crit Care Med. 2000 May; 28(5):1477-82.
196. Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y, 2006. *The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells*. Cell Mol Immunol. 2006 Jun; 3(3):189-95.
197. Young KJ, DuTemple B, Phillips MJ, Zhang L, 2003. *Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells*. J Immunol. 2003 Jul 1; 171(1):134-41.
198. Zamojska R, 1994. *The CD8 coreceptor revisited: one chain good, two chains better*. Immunity. 1994 Jul; 1(4):243-6.

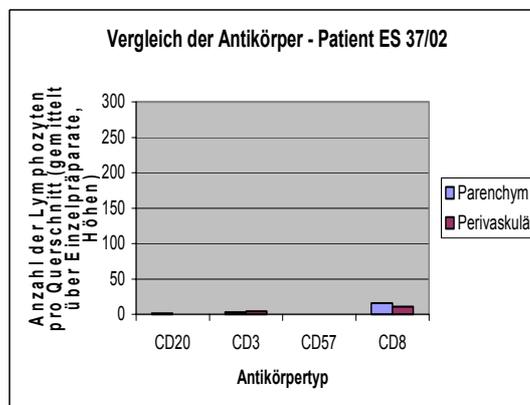
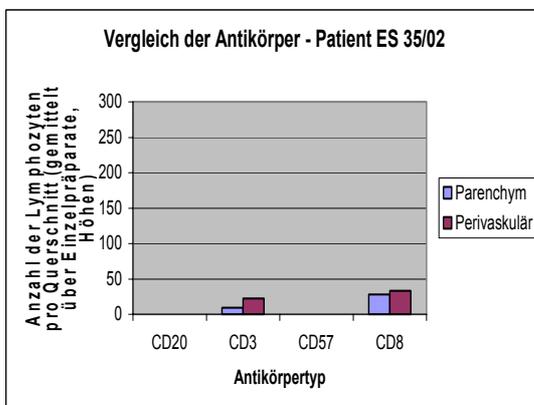
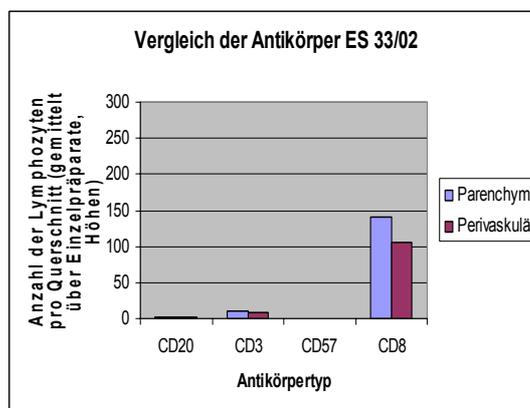
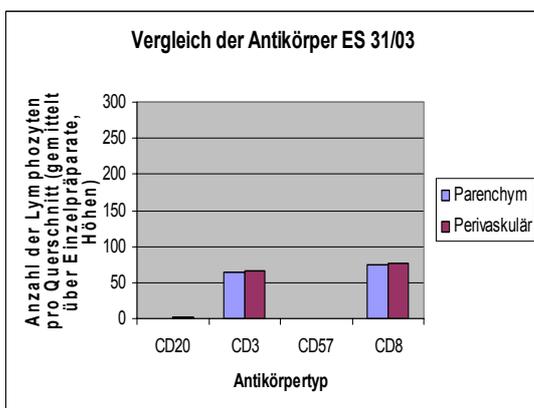
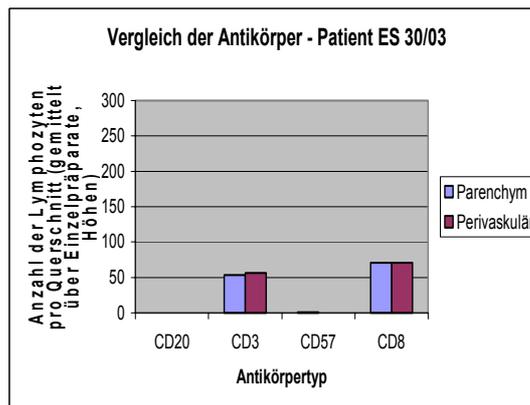
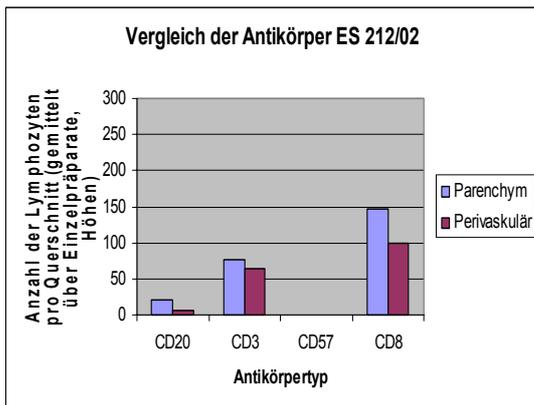
Bibliographie

199. Zhang ZX, Young K, Zhang L, 2001. *CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell*. J Mol Med. 2001 Aug; 79(8):419-27.
200. Zhang D, Yang W, Degauque N, Tian Y, Mikita A, Zheng XX, 2007. *New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses*. Blood. 2007 May 1; 109(9):4071-9. Epub 2006 Dec 29.

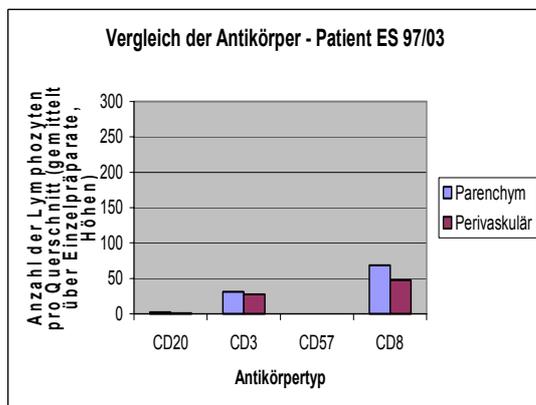
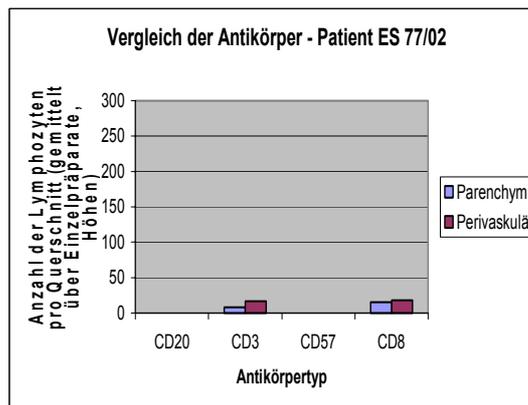
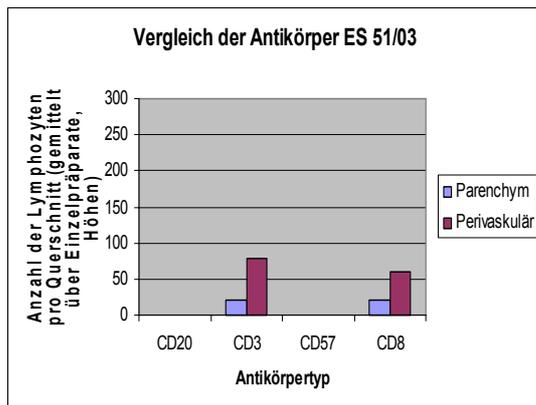
Anhang

Abbildungen pro Patient





Anhang



Danksagung

Hiermit möchte ich meinen tiefsten Dank insbesondere gegenüber meinem Doktorvater Prof. Dr. Meyermann sowie gegenüber meinem Betreuer PD Dr. Michel Mittelbronn ausdrücken. Die Zeit in Tübingen war für mich eine durchweg lehrreiche und interessante Zeit. Prof. Dr. Meyermann und PD Dr. Mittelbronn haben sich immens viel Zeit genommen und waren für alle Anregungen, Kritik und Diskussionen sehr offen. Neben der Doktorarbeit konnte ich einen Einblick in die tägliche Arbeit eines Neuropathologen erhalten und vieles über die Medizin und das Leben lernen. Vielen Dank für die Geduld, gute Laune und fachliche Kompetenz, die sie in diese Arbeit eingebracht haben.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Rudi Beschorner, Prof. Dr. Dr. Perikles Simon und Dr. Jens Schittenhelm für ihre Hilfe bedanken. Frau Prof. Dr. Bornemann und Herr Prof. Dr. Schlüsener haben durch fachliche Anregungen viel beigetragen. Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Dietz, der bei der statistischen Auswertung große Hilfe geleistet hat.

Das Laborteam des Instituts für Hirnforschung war ausgesprochen hilfsbereit und freundlich. Hiermit möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die Hilfe, die netten Gespräche bei Herrn Thai Dung, Frau Ott, Frau Trautmann, Frau Gualtiero, Frau Stoll, Frau Messmer, Frau Albrecht, Frau Wulf, Frau Nagel, Frau Schilling, Frau Kehrer-Schlarbaum, Frau Rau und Herrn Luht herzlichst bedanken. Frau Imhof im Sekretariat stand immer mit Rat und Tat zur Hilfe!

Vielen Dank auch für all die Hilfe von den Mitdoktoranden, insbesondere Dr. Manuel Stoll für die Einarbeitung in die Immunhistochemie sowie Dr. Benjamin Goepfert und Dr. David Capper für die mentale und fachliche Unterstützung und die lustige Zeit. Spezieller Dank gilt Dr. Christian Löffler, der so nett war, mich bei den Granzymfärbungen zu unterstützen.

Großer Dank gilt auch meinem Ehemann und meinen Eltern, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Lebenslauf Ariane Chaudhuri

Persönliche Daten

Name und Adresse: Ariane Michaela Chaudhuri, geborene Schleich

Geburtsdatum: 02.12.1977 in München

Schulische und universitäre Ausbildung

Schulabschluss: Abitur, Gymnasium Gröbenzell, 1997 (Note: 1,8)

Medizinstudium: Physikum, LMU München, März 2001 (Note: 2,6)
 1. Staatsexamen, Freiburg, März 2002 (Note: 3,0)
 2. Staatsexamen, Freiburg, März 2005 (Note: 2,0)
 3. Staatsexamen, Freiburg, Mai 2006 (Note: 1,0)
 Approbation am 15.05.2006 (Gesamtnote 1,8)

Master of Arts: European Master in Intern. Humanitarian Assistance,
 Bochum, Dublin, Yogyakarta (Indonesien), 2006 –
 2007 (Note: 1,7)

Veröffentlichungen

Mittelbronn et al., 2007. *Elevated HLA-E levels in human glioblastomas but not in grade I to III astrocytomas correlate with infiltrating CD8+ cells.* J Neuroimmunol. 2007 Sep; 189(1-2):50-8. Epub 2007 Aug 1.

Mittelbronn et al., 2006. *Albumin in immunohistochemistry: Foe and friend.* Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2006 Dec; 14(4):441-4.

Medizinische Weiterbildung

Innere Medizin: Gastroenterologische Abteilung
 Kreisklinik Fürstfeldbruck
 Chefarzt Prof. Dr. Eissele
 Oktober 2007 – April 2008

Abteilung Nephrologie/Rheumatologie
 Universitätsklinikum Göttingen
 Chefarzt Prof. Dr. Müller
 seit Juli 2008

Göttingen, Januar 2010

A. Chaudhuri