

**Aus dem Zentrum für Neurologie Tübingen
Neurologische Klinik und Hertie-Institut für klinische
Hirnforschung
Abteilung Allgemeine Neurologie
Komm. Leiter: Professor Dr. A. Melms**

**Untersuchungen zum Migrationsverhalten von
T-Lymphozyten anhand der Expression von
CXCR4 und SDF1 bei Ratten mit experimenteller
autoimmuner Enzephalomyelitis.**

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

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

**vorgelegt von
Kathrin Mathilde Schumann**

**aus
Stuttgart**

2008

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. Dr. R. Weissert

2. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Möhle

Meinen beiden Kindern
Pashvac und Lilith

Inhaltsverzeichnis

1	Übersicht über die Abbildungen und Tabellen.....	6
2	Abkürzungen.....	8
3	Einleitung.....	9
3.1	Multiple Sklerose	9
	EAE – ein Tiermodell.....	13
4	Tiermodelle.....	15
4.1	Die Ratte als Versuchstier – ein erfolgreicher Tiermodellträger, nicht nur für MS	15
4.2	CXCR4	16
4.3	Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis.....	20
4.4	Grundlegende Immunologische Konzepte	21
5	Zielsetzung des Promotionsprojektes.....	23
6	Materialien und Methoden.....	25
6.1	Materialien	25
6.1.1	Geräte.....	25
6.1.2	Reagenzien und Chemikalien.....	27
6.1.3	Versuchstiere	27
6.2	Methoden	28
6.2.1	Immunisierung	28
6.2.2	Beurteilung des Erkrankungsverlaufes	28
6.2.3	Sezierung der Versuchstiere und Gewinnung der Organproben ..	29
6.2.4	PCR	30
6.2.4.1	Gewinnung des Knochenmarks	31
6.2.4.2	Zubereitung des Blutes.....	31
6.2.4.3	Auszählen der Lymphozyten in Knochenmark und Blut	32
6.2.5	Methode: FACS (fluorescence-activated cell sorting)	34
6.2.5.1	Aufarbeitung Lymphknoten	34
6.2.5.2	Aufarbeitung ZNS:	35
6.2.5.3	Aufarbeitung des Blutes	37
6.2.6	Methode: MACS (magnetic-activated cell separation)	38

7	Ergebnisse	39
7.1	Ergebnisse des PCR-Projekts	39
7.2	Ergebnisse der Durchflusszytometrie	53
7.3	Ergebnisse des MACS-Projekts	59
8	Diskussion	67
8.1	MACS	74
8.1.1	CD4 CXCR4	74
8.1.2	CD8 CXCR4	75
8.1.3	CD45RA CXCR4	76
8.1.4	CD4 SDF1	77
8.1.5	CD8 SDF1	78
8.1.6	CD45RA SDF1	78
8.2	Aussichten	79
9	Schlussfolgerungen	79
10	Zusammenfassung	81
11	Anhang für Schaubilder	
	Anzahl der Tiere, die je Probe untersucht wurden	83
12	Literaturverzeichnis	88
13	Danksagung	96
14	Lebenslauf	97

15 Übersicht über die Abbildungen und Tabellen

- Abb. E1 Entzündliches Infiltrat bestehend aus Makrophagen und T-Lymphozyten
- Abb. E2 Entzündliches Lymphozyteninfiltrat um das Lumen eines Gefäßes
- Abb. E3 Immunhistochemie auf MBP
- Abb. E4 Gliose mit Axonretraktionsbulbus
- Abb. E5 Reduzierte Axondichte im Bereich der MS-Läsion
- Abb. E6 Axonverlust der weißen Substanz im Bereich einer MS-Läsion, im rechten unteren Bildrand deutliche lymphozytäre Infiltration
- Abb. 1 2D-Struktur von MOG
- Abb. 2 Genkarte CXCR4
- Abb. 3 Dreidimensionale Struktur von SDF1
- Abb. 4 Modell für die Interaktion zwischen CXCR4 und SDF1
- Abb. 5 Herstellung des Percoll-Gradienten
- Abb. 6 Percoll-Gradient nach Beladung und Zentrifugation
- Abb. 7 relative Expression von CXCR4 im Gehirn
- Abb. 8 relative Expression von CXCR4 im Rückenmark
- Abb. 9 relative Expression von SDF1 im Gehirn
- Abb. 10 relative Expression von SDF1 im Rückenmark
- Abb. 11 relative Expression von CXCR4 in der Milz
- Abb. 12 relative Expression von CXCR4 in Lymphknoten
- Abb. 13 Relative Expression von SDF1 in der Milz.
- Abb. 14 Relative Expression von CXCR im Blut
- Abb. 15 Relative Expression von SDF1 im Blut.
- Abb. 16 Relative Expression von CXCR4 im Gehirn
- Abb. 17 Relative Expression von CXCR4 im Rückenmark
- Abb. 18 Relative Expression von CXCR4 in der Milz bei ACI-Ratten.
- Abb. 19 Relative Expression von CXCR4 im peripheren Blut bei ACI-Ratten
- Abb. 20 Relative Expression von CXCR4 in Lymphknoten bei ACI-Ratten
- Abb. 21 Relative Expression von SDF1 im Gehirn bei ACI-Ratten
- Abb. 22 Relative Expression von SDF1 im Rückenmark bei ACI-Ratten.
- Abb. 23 Relative Expression von SDF1 im peripheren Blut bei ACI-Ratten.
- Abb. 24 Krankheitsverlauf bei ACI und DA Ratten
- Abb. 25 Anteil von CD4+ Zellen im FACS-Scan
- Abb. 26 Anteil CD8+ positiver Zellen im FACS-Scan
- Abb. 27 Anteil Ox42-markierter Zellen im FACS-Scan
- Abb. 28 Anteil Ox6 markierter Zellen im FACS-Scan

- Abb. 29 Anteil NK-Zellen im FACS-Scan
- Abb. 30 Anteil $\gamma\delta$ -Zellen im FACS-Scan
- Abb. 31 Anteil CD4+ CXCR4 exprimierende Zellen
- Abb. 32 Anteil CD8+ CXCR4 exprimierende Zellen
- Abb. 33 Expression von SDF1 auf CD 4+ Zellen
- Abb. 34 Expression von CXCR4 auf CD45RA+ Zellen
- Abb. 35 Expression von SDF1 auf CD8 positiven Zellen
- Abb. 36 Expression von SDF1 auf CD45RA+ Zellen
- Abb. 37 CXCR4-Expression auf CD4+ ZNS-infiltrierenden Zellen
- Abb. 38 CXCR4 Expression auf CD8+ ZNS-infiltrierenden Zellen
- Abb. 39 CXCR4 Expression auf CD45+ ZNS-infiltrierenden Zellen
- Abb. 40 SDF1 Expression auf CD4+ ZNS-infiltrierendne Zellen.
- Abb. 41 SDF1 Expression auf CD8+ ZNS-infiltrierenden Zellen
- Abb. 42 SDF1 Expression auf CD45RA+ ZNS-infiltrierenden Zellen

16 Abkürzungen

EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
MBP	Myelin-basisches Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
rrMOG	Rekombinantes Ratten MOG (MOG1-125)
ZNS	Zentrales Nervensystem
EAMG	Experimentelle Autoimmune Myasthenia gravis
EAN	Experimentelle Autoimmune Neuritis
MHC	Major Histocompatibility Complex
IFA	Inkomplettes Freud'sches Adjuvans
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
SDF1	Stroma-cell-derived factor-1
CXCR4	Chemokinrezeptor 4 vom CXC-Typ
FACS	Zytofluorometrie
CFA	Vollständiges Freund'sches Adjuvans

17 Einleitung

17.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste Ursache einer Behinderung im jungen Erwachsenenalter, die nicht traumatischer Genese ist (Martin 1995). Die Epidemiologie zeigt, dass das Haupterkrankungsalter zwischen zwanzig und vierzig Jahren liegt; frühere oder spätere Erstmanifestationen sind aber keinesfalls ausgeschlossen. Die Inzidenz in der BRD dürfte gegenwärtig zwischen 2,5-5 pro 100.000 liegen (Hein 2000). Was die Prävalenz der MS betrifft, zeigt sich ein eindeutiges Nord-Süd-Gefälle, wobei die Prävalenz in äquatorial gelegenen Gebieten am niedrigsten ist. Offenbar ist die MS häufiger in den Gebieten, die ein gemäßigteres Klima haben und wirtschaftlich gut entwickelt sind. Ungeklärt ist jedoch die z.T. widersprüchliche und stark variierende Prävalenz in eng benachbarten Regionen.

Aus Migrationsstudien lässt sich ableiten, dass bei genetisch prädisponierten Personen ein Umweltfaktor in den frühen Lebensjahren eine MS auslösen kann (Rosati 1994). Die Migration vor dem 15. Lebensjahr in Gebiete mit niedrigem Erkrankungsrisiko, in denen die krankheitsauslösenden Umweltfaktoren selten sind, reduziert das Risiko, an einer MS zu erkranken, während die Migration nach dem 15. Lebensjahr keinen Einfluss auf das Krankheitsrisiko hat.

Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich um einen chronisch-entzündlichen Entmarkungsprozess im zentralen Nervensystem (ZNS). Die pathologischen Charakteristika wurden vor über 150 Jahren von Jean Martin Charcot (1825-1893) beschrieben, der in seinen Vorlesungen bereits die klassische MS-Symptomtrias Nystagmus, Intentionstremor und skandierende Sprache herausstellte (Charcot 1872-1873).

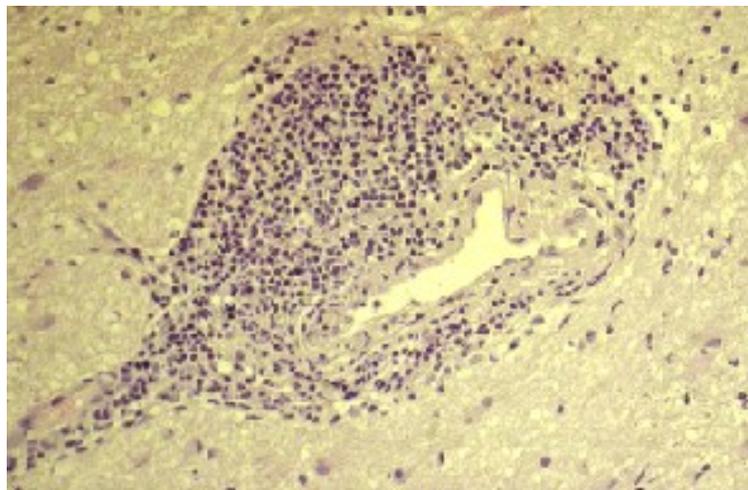
Heute werden die wesentlichen Strukturmerkmale als fokale, scharf begrenzte Entmarkungsherde, die mit einer Entzündung, astrozytärer Gliose und variabler Axondestruktion assoziiert sind, beschrieben (Lassmann 1998). Die Läsionen

sind im gesamten Zentralnervensystem zu finden mit einer Prädilektion für die Sehnerven, den Hirnstamm, das Rückenmark, das Kleinhirn und die periventrikuläre weiße Substanz.

Die Multiple-Sklerose-Läsion ist trotz intensiver Untersuchungen in den letzten Jahren immer noch unvollständig verstanden. Traditionell wurde die MS als eine Autoimmunerkrankung angesehen, bei der autoreaktive T-Zellen, die gegen Myelinbestandteile des ZNS gerichtet sind, einen Entzündungsprozess induzieren, der zu einer sekundären Makrophagen-Rekrutierung mit daraus folgender Myelindestruktion führt (Martin 1995). Neuere Daten sprechen dafür, dass die Immunpathogenese der MS komplizierter ist als bisher angenommen. Diese Befunde überraschen aufgrund der bekannten klinischen, radiologischen, genetischen und morphologischen Heterogenität der Erkrankung nicht.

Das charakteristische strukturelle Merkmal der Multiplen Sklerose ist der Nachweis multifokaler, entmarkter Plaques (Abb. 1). Diese entstehen auf dem Hintergrund einer entzündlichen Reaktion, die vorwiegend aus Makrophagen und T-Lymphozyten besteht (Abb. E1 & E2).

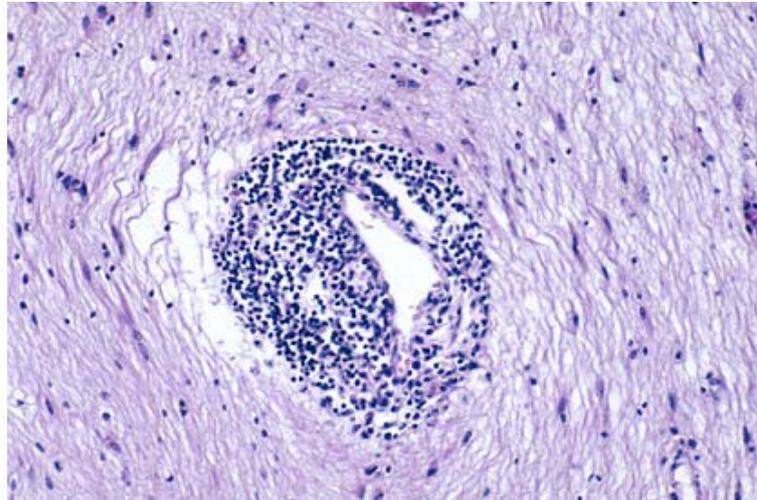
Abb. E1
Entzündliches Infiltrat bestehend aus Makrophagen und T-Lymphozyten; zur Verfügung gestellt von National Multiple Sclerosis Society, USA.



MS-Läsionen können als aktiv oder inaktiv definiert werden, was sich auch in der Bildgebung, z.B. Kernspintomographie (MRT) mit Kontrastmittel, darstellen lässt. Die Aktivierung von Makrophagen und die Phagozytose von

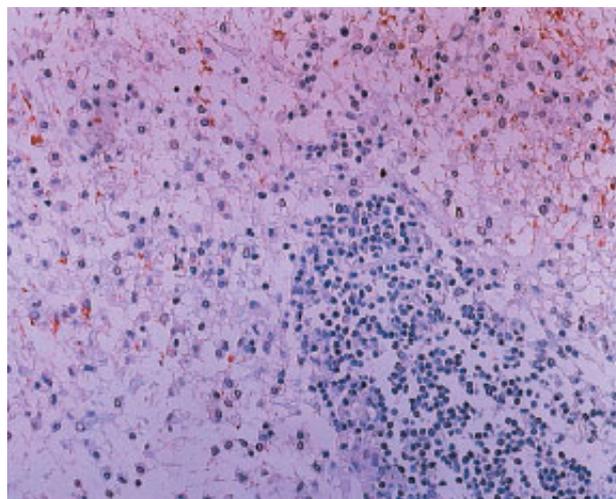
Myelinproteinen in den Läsionen sind verlässliche Indikatoren eines aktiven Entmarkungsprozesses (Brück 1995).

Abb. E2
Entzündliches
Lymphozyteninfiltrat
um das Lumen eines
Gefäßes;
mit freundlicher
Genehmigung
D. Agamanolis,
Akron Children's
Hospital, Ohio, USA.



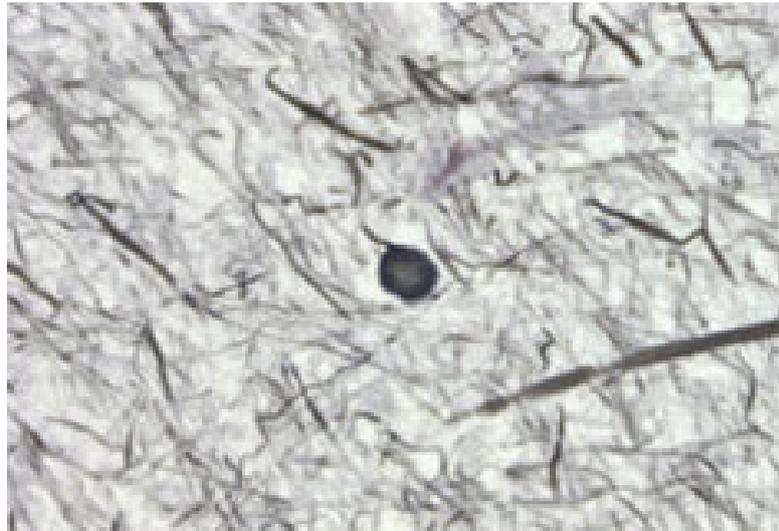
Gerade aktiv entmarkende MS-Läsionen weisen eine massenhafte Makrophageninfiltration auf; die Makrophagen enthalten in ihrem Zytoplasma Myelinabbauprodukte, welche beispielsweise durch Immunhistochemie Verfahren nachgewiesen werden können (Abb. E3)

Abb. E3
Immunhistochemie auf
MBP;
mit freundlicher
Genehmigung
Dr. Naoko Dohi, Suwa
Red Cross Hospital,
Nagano, Japan.



Der chronisch inaktive MS-Plaque ist ein scharf begrenzter, hypozellulärer Plaque, in dem es keinen Anhalt für einen aktiven Myelinabbau gibt. In diesen Läsionen besteht eine ausgeprägte fibrilläre Gliose, die der Erkrankung letztendlich ihren Namen gegeben hat (Abb. E4). Hier ist die Anzahl der Oligodendrozyten, der myelinisierenden Zellen des Zentralnervensystems, deutlich reduziert oder sie fehlen komplett.

Abb. E4
Gliose mit
Axonretraktions-
bulbus;
mit freundlicher
Genehmigung Prof.
Richard Reynolds,
Imperial College
London, England.



Der damit verbundene Axonverlust zeigt sich sehr deutlich in histologischen Präparaten und ist zum Teil mit für die scharfe Abgrenzung der MS-Plaques verantwortlich (Abb. E5 & E6).

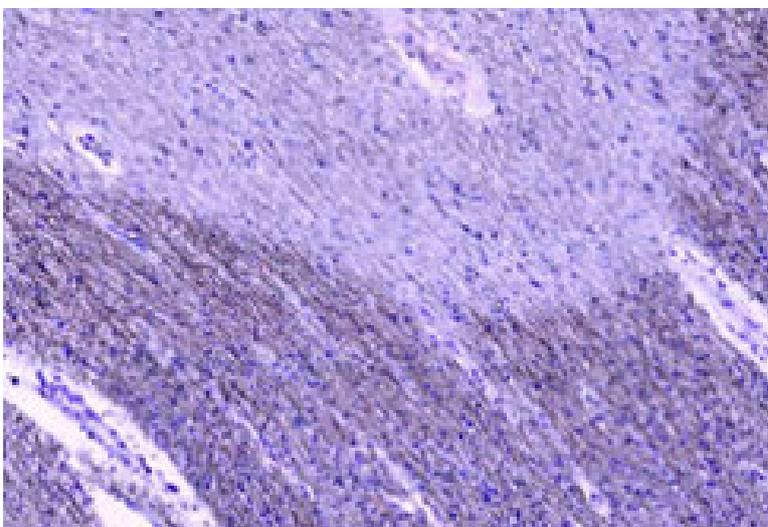


Abb. E5
Reduzierte Axondichte
im Bereich der MS-
Läsion, oben in der
Abbildung; mit
freundlicher
Genehmigung Prof.
Richard Reynolds,
Imperial College
London, England.

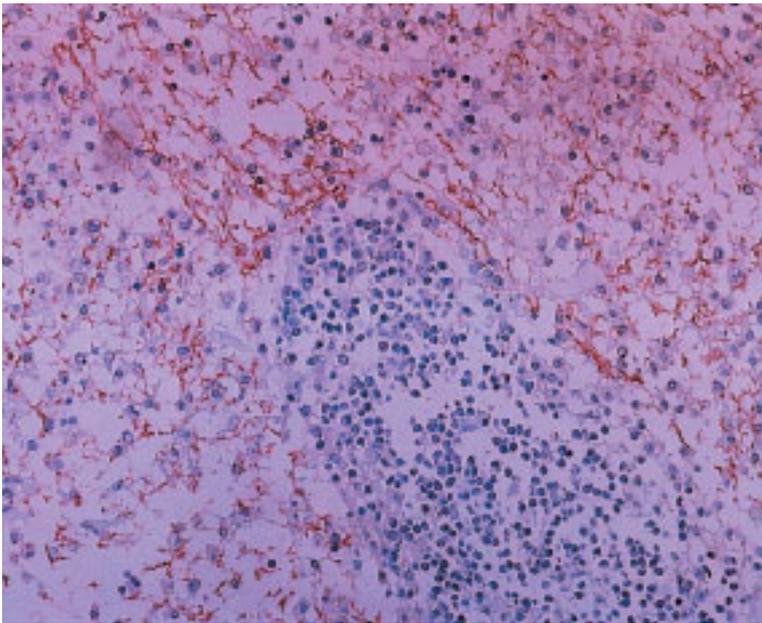


Abb. E6

Axonverlust der weißen Substanz im Bereich einer MS-Läsion, im rechten unteren Bildrand deutliche lymphozytäre Infiltration; mit freundlicher Genehmigung Dr. Naoko Dohi, Suwa Red Cross Hospital, Nagano, Japan.

Zahlreiche neuropathologische Untersuchungen von MS-Entzündungen haben den Nachweis der Remyelinisierung erbracht. Diese ist in den chronischen MS-Läsionen häufig inkomplett und auf den Rand des entmarkten Plaques beschränkt. Die Untersuchungen von Läsionen aus der frühen oder akuten Krankheitsphase zeigen jedoch extensive Hinweise auf eine Remyelinisierung, die den gesamten Plaqueumfang erfassen (Lassmann 1997). Initial wurden diese Areale als inkomplett entmarkte Plaques angesehen. Untersuchungen von Pender (Pender 1985) und Lassman (Lassmann 1997) konnten aber eindeutig beweisen, dass es sich um eine Remyelinisierung eines zuvor autoimmun demyelinisierten Plaques handelt und nicht um eine unvollständige Demyelinisierung.

EAE – ein Tiermodell

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS). Sie kann als experimentelle Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) in Ratten, Mäusen und Affen induziert werden, indem man diese mit Komponenten der Myelinscheiden des ZNS impft. Die Form der

EAE, die durch aktive Impfung mit Myelin-basisches-Protein (MBP) hervorgerufen wird, ist durch die Infiltration von T-Lymphozyten in das ZNS charakterisiert und führt in der Regel zu einer monophasisch verlaufenden Erkrankung bei LEW, DA, nicht aber bei ACI Ratten.

Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) ist eine Komponente der Myelinscheiden, welche im Gegensatz zu dem tief im Myelin-Molekül verborgenen MBP auf der Oberfläche der Myelinscheiden vorhanden und daher für Antikörper leicht zugänglich ist.

Die aktive Immunisierung mit dem extrazellulären Teil des MOG (rrMOG aa1-125) führt zu unterschiedlichen Immun-Effektor-Mechanismen, die für das ZNS spezifisch sind und mit denen des MBP verglichen werden können. Während die Immunisierung mit MBP in eine nur wenig entzündlich charakterisierte, monophasische Erkrankung mündet, kann durch eine Immunisierung mit MOG eine chronische demyelinisierende Erkrankung des ZNS hervorgerufen werden.

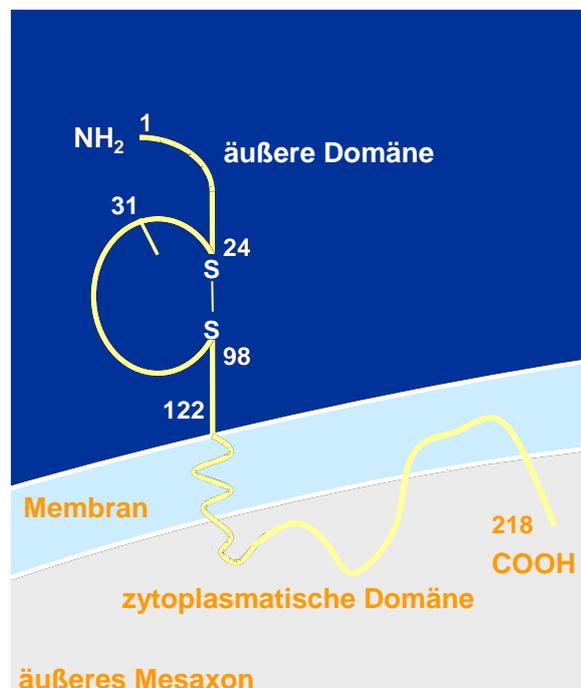


Abb. 1. 2D-Struktur von MOG

18 Tiermodelle

18.1 Die Ratte als Versuchstier – ein erfolgreicher Tiermodellträger, nicht nur für MS

Die normalerweise für Laborversuche verwendeten Rattenstämme stammen allesamt von der gewöhnlichen braunen Ratte ab (*Rattus norvegicus*). Seit Anfang des 20. Jahrhunderts wurden inzüchtigte Rattenstämme durch kontinuierliche Zusammenführung von Schwester und Bruder bzw. Eltern zu Kindern gezüchtet.

Ratten eignen sich für eine Vielzahl von Tiermodellen humaner Krankheiten. Im Gebiet der Neuroimmunologie gibt es EAE als Modell für die MS, die experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (EAMG) als Modell für die humane Myasthenie sowie die experimentelle autoimmune Neuritis (EAN) als Simulation des Guillain-Barré-Syndroms. Über die Jahre hinweg hat sich in unserem Labor die Ratte gegenüber den Mäusen als Tiermodell etabliert, da die Krankheit hier in einer Weise induziert wird, die die Reproduzierbarkeit wesentlich vereinfacht. Darüber hinaus unterscheidet sich das Immunsystem der Ratte von der Maus in manchen Punkten, wobei das Immunsystem der Ratte am ehesten mit dem des Menschen zu vergleichen ist, da sowohl Ratte als auch Mensch den Major Histo Compatibility Complex (MHC), Histokompatibilitätskomplex, der Klasse II auf aktivierten T-Zellen aufweisen.

Eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Migration spielen Chemokine und ihre Rezeptoren.

Chemokine stellen eine Gruppe von Proteinen dar, welche die gerichtete Migration und Aktivierung von Leukozyten steuern. Diese Proteine werden in zwei Hauptfamilien eingeteilt, nämlich CXC- oder CC-Chemokine. Seit neuerem sind weitere Proteine identifiziert worden, die zwei neue Klassen zu der Nomenklatur hinzufügen; hierbei handelt es sich um die Gruppe der CX3c und C Chemokine, wobei sich die Nomenklatur an der Position von hochkonservierten Cysteinresten orientiert. Sowohl die CC als auch die CXC

Chemokine binden an Sieben-Transmembran-Domänen-G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche das Signal über heterotrimere G-Proteine ins Zellinnere leiten (Feng 1996).

In der vorliegenden Arbeit werden vor allem CXCR4, sein Ligand SDF1 und deren Rolle bei der Migration von T-Lymphozyten in ZNS-Strukturen untersucht.

18.2 CXCR4

CXCR4 ist ein α -Chemokinrezeptor, sein natürlicher Ligand SDF1 ist ein β -Chemokin. SDF1 wurde zunächst als ein Faktor beschrieben, der von Knochenmark-Stroma-Zellen produziert wurde und die Proliferation von Plasmazellen sowie deren Reifung zu B-Zellen reguliert.

CXCR4 wird aber nicht nur von T-Lymphozyten exprimiert, sondern auf einer Vielzahl anderer Zellen, wie Granulozyten und Makrophagen, vaskulären Endothelzellen, Neuronen sowie Mikroglia und Astrozyten.

CXCR4 gehört zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Dockt sein Ligand SDF1 an, so wird CXCR4 aktiviert, was seine Dimerisierung beinhaltet, wodurch es wiederum zur Interaktion mit der Alpha-Untereinheit eines inhibierenden G-Proteins kommt. Der weitere Weg der Kaskade führt über Phosphorylierung von JAK2/JAK3 Kinasen zur Aktivierung durch Phosphorylierung von STAT Faktoren (Signal Transducers and activators of transcription). Die Aktivierung dieser Faktoren führt zu einer verstärkten Transkription bestimmter Gene, die unter anderem für die Regulation von Zytoskelettproteinen und die Zellmigration verantwortlich sind (Zhang 2001).

Das menschliche CXCR4 Gen kodiert für 352 Aminosäuren (siehe Abb. 1). Die am Amino-Ende gelegenen Aminosäuren werden vom ersten Exon codiert, die restlichen 342 vom zweiten Exon (Wegener et al., 1998). Die bei Menschen und Mäusen transkribierte mRNA umfasst 1,7-1,9kb, es sind aber durch alternatives Splicing entstandene längere oder kürzere Transkripte bekannt (Gupta 1999).

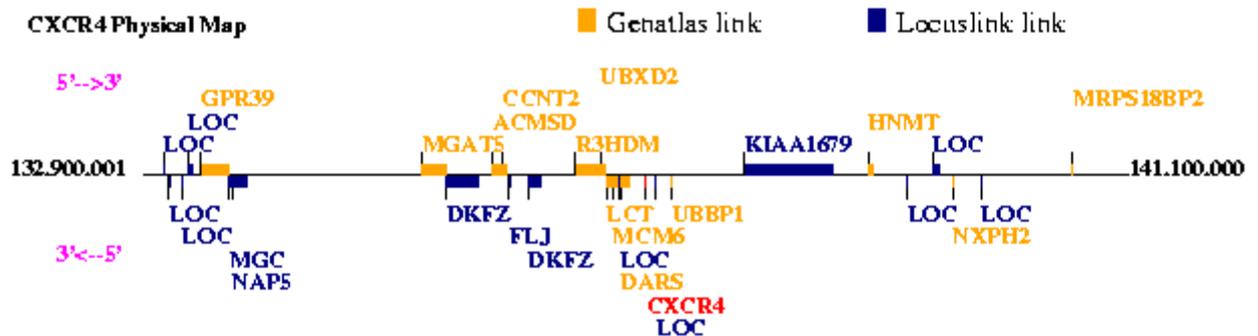


Abb. 2. Genkarte CXCR4

Es wird vermutet, dass CXCR4 eine entscheidende Rolle bei der Migration immunkompetenter Zellen, unter anderem in das immunologisch privilegierte zentrale Nervensystem spielt. Er liegt im Interesse der MS-Forschung, da es eindeutige Belege für seine hohe Relevanz im Zusammenhang mit Invasion von Immunefektorzellen ins ZNS und bei der Modulation der Blut-Hirn-Schranke gibt (Avasarala 2005).

Auch bei der HIV-Infektion von T-Zellen spielt CXCR4 eine wichtige Rolle. Beim HIV-Virus sind verschiedene Stämme zu unterscheiden, welche prinzipiell alle ein bestimmtes Glykoprotein auf der Oberfläche ihrer Envelope, nämlich gp 120 exprimieren. Gp 120 ist Ligand für den CD4-Rezeptor. HIV infiziert generell alle Zellen, die CD4+ sind, vornehmlich T-Helferzellen und Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems. Dazu sind auch Co-Rezeptoren notwendig, zu deren wichtigsten CCR5 (Makrophagentrope Stämme „R-5“) und CXCR4 (T-Zelltrope X4-Stämme) gehören.

CCR 5 und CXCR4 sind nicht nur Hauptkorezeptoren für HIV-Stämme, denn über die Beteiligung von CD4 als Korezeptor hinaus wurde gezeigt, dass HIV-2-Viren CD4-unabhängig unter Vermittlung von CXCR4 allein Zellen infizieren können (Endres et al. 1996).

Der Ligand von CXCR4, SDF1 (CXCL12), gehört zu der Klasse der α -Chemokine, eine Untergruppe der CXC-Chemokine. SDF1 weist einige Besonderheiten im Vergleich zu den restlichen Chemokinen der CXC-Familie auf.

Es hat nur eine geringe Sequenzhomologie mit diesen und scheint somit eine weitere Subgruppe der CXC-Chemokine auszumachen. Zudem ist sein Gen-Lokus für ein Chemokin der CXC-Klasse außergewöhnlich: CXC-Chemokine werden von Genen auf den Chromosomen vier oder 17 codiert, das SDF1 Gen hingegen ist auf Chromosom 10 lokalisiert. SDF1 hat auch mit Abstand das höchste Ausmaß von Interspezies-Konservierung: 99% des menschlichen Sequenz sind mit der der Maus identisch (Tashiro1993).

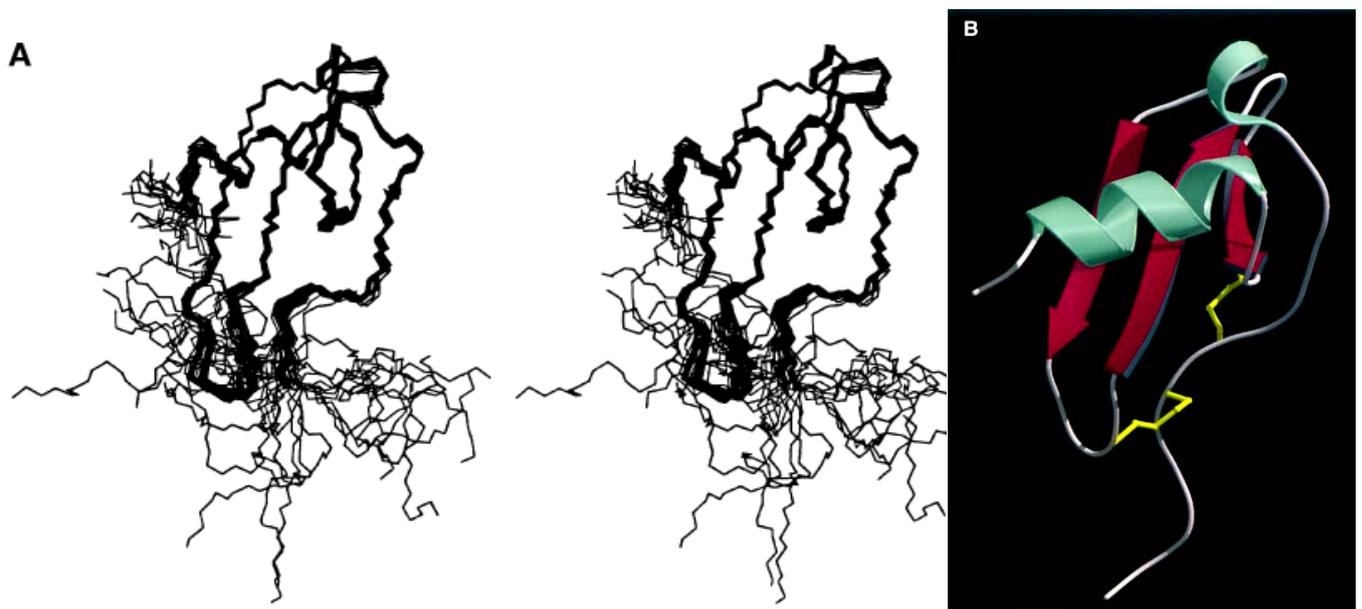


Abb. 3. Dreidimensionale Struktur von SDF1.

A: Stereoansicht einer Superposition von 30 möglichen Anelings Strukturen von SDF1 (Cruppp 1997)

B: Reduziertes 3-D Modell von SDF1 (Meritt 1994)

SDF1 wird konstitutiv von Knochenmark Stroma Zellen exprimiert und wird auch in vielen anderen Zellen gefunden. SDF1 ist Mitglied der Familie der proinflammatorischen Chemokine und stellt einen äußerst potenten chemotaktischen Reiz für Leukozyten und Monozyten dar und fördert darüber hinaus die Proliferation und Reifung von B-Lymphozyten (Shirozu 1995).

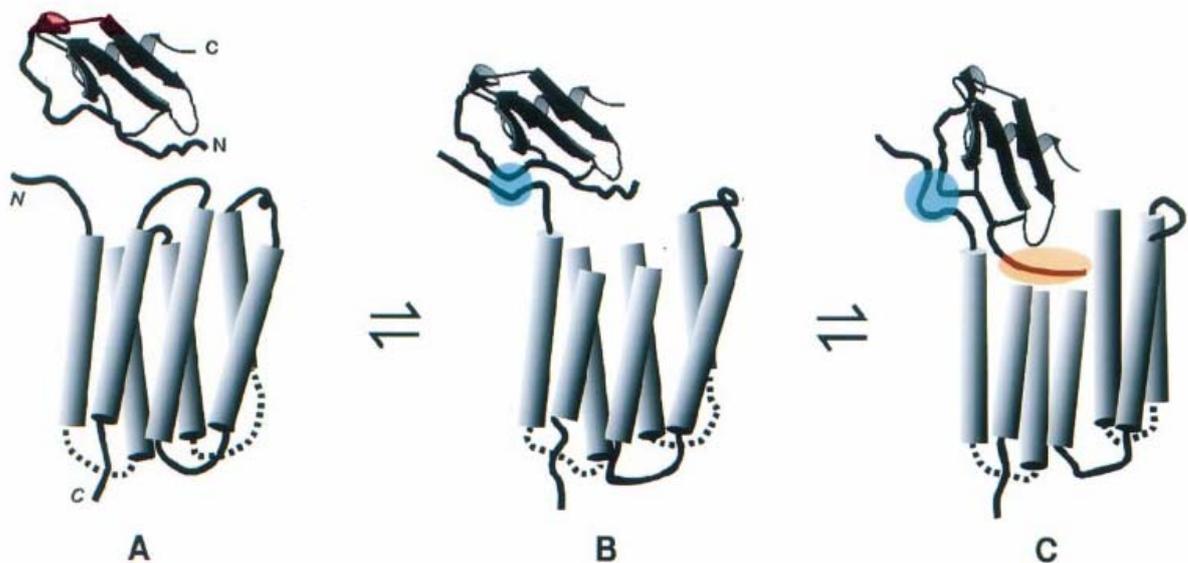


Abb. 4. Modell für die Interaktion zwischen CXCR4 und SDF1.

CXCR4 ist als 7-Transmembran-Helices-Rezeptor (Helices als Zylinder) dargestellt. Die Helices sind untereinander inner- und außerhalb der Zelle mit loops verbunden. Die N- und C- terminalen Enden des Rezeptors und des Liganden sind jeweils mit N und C gekennzeichnet. (Crumpp 1997).

- A: Ligand und Rezeptor separat vor der Bindung.
- B: Interaktion von SDF1 mit dem N-terminalen Rezeptorsegment. Die Kontaktstelle ist mit einem blauen Punkt markiert. Zwei der Rezeptorhelices verkürzen sich, um die tatsächliche Bindungsstelle des Rezeptors freizugeben.
- C: N-terminale Region von SDF1 fest in der binding site von CXCR4 gebunden (orange Markierung). Diese Bindung aktiviert den Rezeptor, was zur Konformationsänderung führt.

SDF1 scheint daher weniger ein Mediator der Entzündungsreaktion zu sein, sondern spielt vermutlich bei der Immunüberwachung eine bedeutende Rolle. Es wurde nachgewiesen, dass ihm eine tragende Rolle bei der Rezirkulation von Lymphozyten und hämatopoetischen Stammzellen zukommt (Aiuti 1996). Zudem wurde SDF1 auch in menschlichen arteriellen Endothelzellen gefunden. In diesen Zellen wurden zehn verschiedene Gene nachgewiesen, deren mRNA SDF1 α -abhängig exprimiert wurde.

Die meisten Chemokine werden in Abhängigkeit von Cytokinen produziert, SDF1 hingegen wird konstitutiv exprimiert (Shirozu 1995).

In Übereinstimmung mit seinen in vitro nachgewiesenen Funktionen, haben SDF1-knock out Mäuse schwere Störungen in der Myelo- und Lymphopoese (Nagasawa 1996). Die in vitro offensichtlichen Effekte von SDF1 auf junge und naive Zellen lassen vermuten, dass SDF1 wichtige Funktionen bei der Migration und dem homing von Lymphozyten und haematopoetischen Zellen hat (Aiuti 1996).

Darüber hinaus werden sowohl SDF1 (Shirozu 1995) als auch sein Rezeptor, CXCR4 (Federspiel 1993) nicht nur auf lymphatischen und haematopoetischen Zellen sondern auf einer Vielzahl unterschiedlichster Zellen aus den unterschiedlichsten Geweben exprimiert.

18.3 Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Wie bereits erwähnt ist die EAE ein sehr gutes Tiermodell für MS. Sie kann durch verschiedene Methoden induziert werden: entweder man impft die Versuchstiere aktiv mit Komponenten der Myelinscheiden (Wekerle et al. 1994) oder man überträgt CD4⁺ T-Lymphozyten, die eine Reaktivität gegen die Myelinscheiden zeigen (Ben-Nun et al. 1981; Pettinelli and McFarlin 1981). Als empfängliche Versuchstiere gelten Mäuse, Ratten und Affen, aber auch andere Spezies.

Hervorzuheben ist, dass bisher mit einer Ausnahme keine spontane, endogene Form der EAE bekannt ist. Diese Ausnahme betrifft die Hundestaupe, bei der sowohl autoimmune Faktoren als auch virusinduzierte Entmarkungen diskutiert werden (Lampert 1978).

18.4 Grundlegende Immunologische Konzepte

Das Immunsystem bewältigt vielfältige Aufgaben in unserem Organismus, es schützt uns vor Infektionen durch Erreger aus dem mikrobiologischen Spektrum genauso wie es hilft, körpereigene, sequestrierte Zellen abzubauen.

Man kann das Immunsystem auf verschiedene Weise einteilen, wobei stets fließende Übergänge bestehen:

Zum einen wird die humorale von der zellulären Abwehr unterschieden, des Weiteren unterscheidet man das angeborene Immunsystem vom Erworbenen mit seinen Gedächtniszellen (Carroll et al. 1998). Die erste Immunbarriere wird bereits durch das Integumentum und Schleimhäute gebildet (Sharp et al. 2004). Diese verfügen sowohl über Systeme der angeborenen als auch der erworbenen Immunität – das Komplementsystem, Mediatoren, NK-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen.

Infektionen treten nur auf, wenn Pathogene diese Immunbarrieren durchbrechen können. Wie wichtig die epitheliale Schutzfunktion für den Körper ist, erkennt man erst, wenn diese Barriere gestört wird, sei es durch Wunden oder Verbrennungen, bei denen Infektionen immer noch eine gefürchteten Mortalitäts- und Morbiditätsfaktor darstellen.

Zellen, die an die Immunität vermitteln, sind Lymphozyten und Phagozyten. Lymphozyten erkennen Antigene auf Pathogenen, Phagozyten internalisieren Pathogene und degradieren diese.

Bei den Phagozyten unterscheidet man mononukleäre von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, deren gemeinsame Aufgabe in der Phagozytose von Pathogenen und deren Degradierung besteht.

Lymphozyten – in dieser Arbeit besonders wichtig – werden wiederum in zwei Haupttypen unterteilt, B-Zellen und T-Zellen.

Jede B-Zelle trägt einen für sie spezifischen B-Zell-Rezeptor für ein bestimmtes Antigen. Wenn dieses Antigen erkannt wird, vermehrt sich die entsprechende B-Zelle und differenziert zu Plasma-Zellen, welche in kurzer Zeit eine große Zahl Antikörper produzieren. Zudem tragen B-Zellen noch viele Corezeptoren und andere für sie spezifische Membranoberflächen. CD8 ist spezifisch für B-Zellen und eignet sich daher für den Nachweis von B-Zellpopulationen.

Bei T-Zellen unterscheidet man verschiedene Typen, die unterschiedliche Funktionen im Organismus erfüllen. T-Helfer-Zellen (TH1) erkennen mit ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor die von den infizierten Zellen über MHCII präsentierten Peptide. TH1-Zellen stimulieren über Zytokine Makrophagen. T-Helfer-Zellen vom Typ TH2 interagieren ähnlich; diese jedoch dämpfen die systemischen Reaktionen von TH1-Zellen und stimulieren die Aktivitäten der B-Lymphozyten. Diese Gattung von T-Zellen besitzt als Hauptrezeptor CD4 (Lider 1991).

T-Zellen vom zytotoxischen Typ oder T-Killer-Zellen, erkennen ebenfalls MHC-II-präsentierte Antigene und zerstören die infizierte Zelle. Ihr Hauptrezeptor ist CD8 (Ford 2004). Zur Signalübermittlung ist neben den Hauptrezeptoren eine große Anzahl an Korezeptoren nötig.

19 Zielsetzung des Promotionsprojektes

Das Promotionsprojekt möchte die immunopathogenen Mechanismen, weshalb T-Lymphozyten im Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose die ihnen sonst verschlossene Blut-Hirn-Schranke überqueren können und die Myelinscheiden im Gehirn zerstören, weiter aufklären.

Das Augenmerk soll gänzlich auf den Chemokinrezeptor CXCR4 und seinen Liganden SDF1 (CXCL12) gelegt werden, da zum einen in Expressionsanalysen mit Affymetrix® im Tiermodell der Multiplen Sklerose eine deutliche Heraufregulation von CXCR4 im Lymphknoten und ZNS gezeigt wurde und gerade SDF1 in ruhenden T-Lymphozyten eine CXCR4 vermittelte Migration induziert. Zudem ist SDF1 für das sog. Homing und Trafficking der Lymphozyten verantwortlich.

Im Promotionsprojekt soll nun anhand von Genexpressionsprofilen für CXCR4 und SDF1 gezeigt werden, ob diese in unterschiedlichen Organen und Zellpopulationen von Rattenstämmen unterschiedlicher Suszeptibilität für die Ausprägung der Erkrankung exprimiert werden, wie die Expression beeinflusst werden kann, und welche funktionelle Auswirkung die jeweilige Expression auf die Erkrankung hat.

Hierzu soll die mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein(MOG)–induzierte experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) als Tiermodell in der Ratte angewandt werden: Im ZNS finden sich wie bei der Multiplen Sklerose entzündliche und entmarkende Läsionen mit Axonverlust. Zudem können unterschiedliche Krankheitsverläufe induziert werden.

Die Umsetzung der Ziele dieser Arbeit soll anhand von drei technologischen Ansätzen verwirklicht werden:

Zunächst mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion, mit der die Genexpression von SDF1 und CXCR4 in den untersuchten Zellen direkt zum Zeitpunkt der Entnahme dargestellt werden kann. Daraufhin soll in 2 weiteren Projekten, der

Durchflusszytometrie und der magnetischen Zellseparation, mittels Markierung mit gegen Oberflächenepitope bestimmter Zellpopulationen gerichteter Antikörper der aus Gewebeproben erhaltene Zellmix nach bestimmten Populationen aufgetrennt werden. An diesen Populationen soll dann die Exprimierung von CXCR4 und SDF1 mittels mRNA-Bestimmung über die Herstellung von cDNA und PCR genau untersucht werden.

20 Materialien und Methoden

20.1 Materialien

20.1.1 Geräte

Sterile Arbeitsbank (Laminar Airflow Box)	NUAIRE
Inversionsmikroskop	WILL
Pipetierhilfe Accu-Jet®	BRAND
50 ml Schraubdeckelröhrchen (Falcon Tubes)	GREINER
15 ml Schraubdeckelröhrchen (Falcon Tubes)	GREINER
18 G Kanülen	BRAUN
21 G Kanülen	BRAUN
Dreiwegehahn	BRAUN
25 ml Sterilpipetten, wattiert	FALCON
10 ml Sterilpipetten, wattiert	FALCON
5 ml Sterilpipetten, wattiert	FALCON
Rüttler Vortex	NEOLAB
PCR-Gerät ABI-Prism® 7000	Applied Biosystems
PCR Auswerte Software ABI-Prism® 7000	Applied Biosystems
1 ml Spritze	BD
5 ml Spritze	BD
10 ml Spritze	BD
Petrischale, klein	GREINER
Petrischale, standard	GREINER
0,1 µm Filtersieb	FALCON
Zählkammer nach Neubauer	ASSISTENT

Präzisionspipette 0-20 µl	GILSON
Präzisionspipette 0-100 µl	GILSON
Präzisionspipette 0-500 µl	GILSON
Präzisionspipette 0-1000 µl	GILSON
Transferpipette-12, 50-300 µl Dispensiervolumen	BRAND
Pipettenspitzen, bis 100µl	SAARSTEDT
Pipettenspitzen, bis 1ml	SAARSTEDT
Blutentnahmeröhrchen, 5ml EDTA (Monovette®)	SAARSTEDT
Adapter für Monovette®	SAARSTEDT
Isobehälter für flüssigen Stickstoff	Thermos
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH)
CO ₂	Linde
20 G Kanüle	BRAUN
96-Loch PCR-Platten (Abgene 96-well plate)	Applied Biosystems
Plattenverschweißgerät	Abgene
Clear Seals® PCR-Plattenfolie	Abgene
Feinwaage	SARTORIUS
Zentrifuge	HAEREUS
Tischzentrifuge	EPPENDORF
Molinea-Tuch	HARTMANN
2L Kunststoff-Laborgefäß	BRAND
Plexiglasdeckel zum 2L Laborgefäß	WERKSTATT DES UKT
Heizblock NeoBlock 1	NEOLAB
Butterfly® 18G Blutentnahme/Infusionsnadel	BD BEKTON DICKENSON

20.1.2 Reagenzien und Chemikalien

PBS-Puffer	GIBCO
Mykobacterium Tuberculosis, Stamm, abgetötet	DIFCO
Inkomplettes Freud's Adjuvans	SIGMA
1% BSA	SIGMA
Ethanol, 70%	Merck
2-Mercaptoethanol	SIGMA
Diethyl-Ether	Riedel-De-Hahn
DNase I	Roche
Rneasy Kit ®	QIAGEN

20.1.3 Versuchstiere

Zur Verfügung standen fünf verschiedene ingezüchtete und MHC-kongene Rattenstämme, wovon vier verwendet wurden:

Stamm	Haplotyp	Klasse I	Klasse II	Klasse III	Klasse IV
		RT1.A	RT1.B	RT1.D	RT1.C
LEW.1N	N	n	n	n	n
LEW.1AV1	Av1	a	a	av1	av1
DA	Av1	a	a	av1	av1
ACI	Av1	a	a	av1	av1

Tab. 1 Ingezüchtete Rattenstämme und RT1 Haplotypen (Hedrich 1990).

Die LEW-Ratten wurden von Prof. Hans Hedrich von der medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Die DA Ratten wurden von

Harlan Winkelmann (Brochen, Deutschland), die ACI Ratten von Harlan USA (Indiana, IN) gekauft.

20.2 Methoden

20.2.1 Immunisierung

Zur Immunisierung wurden die Tiere mit einer einfachen Ether-Inhalationsnarkose betäubt. Hierzu wurde ein mit circa 15 ml Ether getränktes Molinea-Tuch in ein 2 Liter Kunststoff Laborgefäß gegeben, drei Ratten hineingesetzt und das Gefäß mit einer Plexiglasplatte abgedeckt und etwa 1,5 bis 2,5 Minuten gewartet, bis die Betäubung eingesetzt hat. Die Ratten wurden dann intradermal an der Schwanzwurzel mit 200 µl Inokulum geimpft.

Das Inokulum bestand aus je 50 µg MOG in 100 µl PBS gemischt mit 200 µg Mycobacterium Tuberculosis (MT) plus 100 µl IFA.

Beim unten dargestellten PCR-Projekt wurden neben der naiven Kontrollgruppe noch weitere Kontrollgruppen angelegt, und zwar wurden diese auch mit jeweils 200µl immunisiert, jedoch bestand das Inokulum bei den verschiedenen Tiergruppen aus

1. 100 µl PBS gemischt mit 100 µl IFA sowie
2. 100 µl PBS gemischt mit 200 µg MT plus 100 µl IFA und
3. 50 µg MOG in 100 µl PBS gemischt mit 100 µl IFA.

20.2.2 Beurteilung des Erkrankungsverlaufes

Die Tiere wurden nach der Immunisierung täglich auf ihr Gewicht, den Zustand ihres Felles und neurologisch untersucht. Die neurologische Untersuchung

fokussierte bei den DA-Raten vor allem die Eigenbeweglichkeit des Schwanzes, bei den anderen Stämmen wurde auf das Bewegungsmuster, den Bewegungsradius sowie auf Kleinhirnzeichen geachtet.

Die klinische Beurteilung des Erkrankungsstadiums wurde angelehnt an der Einteilung von Weissert et al. :

- Grad 0: keine klinischen Kennzeichen
- Grad 1: Schwäche oder Lähmung des Schwanzes
- Grad 2: Paraparese oder Hemiparese der Hinterläufe
- Grad 3: Paralyse oder Hemiparalyse der Hinterläufe
- Grad 4: Tetraplegie oder Tod

20.2.3 Sezierung der Versuchstiere und Gewinnung der Organproben

Die Versuchstiere wurden vor der Sezierung mit CO₂ betäubt: Das Tier wurde dazu in einem von der Werksatt des UKT aus Plexiglas gefertigten Spezialkäfig, der Luftdicht verschlossen werden kann und über eine CO₂-Einleitung verfügt, gesetzt. Bei dicht verschlossenem Deckel wurde CO₂-Gas eingeleitet, bis die erwünschte Narkosetiefe erreicht war.

Danach wurde das Versuchstier entnommen und auf einem Präparierblock aus Styropor, der mit Molinea bezogen war, mit 18G Kanülen an den Extremitäten in Rückenlage fixiert und das Operationsfeld mit 70% Ethanol besprüht, damit die Kontamination mit Fellhaaren beherrschbar bleibt.

Die Präparation begann mit der Eröffnung der Peritonealhöhle, gefolgt von der Eröffnung des Thorax. Unverzüglich nach der Blutentnahme aus dem rechten Herzventrikel wurde mit einem Butterfly in den linken Ventrikel eingestochen und das Tier mit 50ml PBS (Gibco) perfundiert. Durch die PBS-Perfusion wird das Blut aus den Organen gespült, um eine Verfälschung der entsprechenden Proben zu vermeiden.

Die zur Präparation verwendeten Instrumente wurden in 70% Ethanol zwischen den einzelnen Arbeitsgängen gereinigt, um Verfälschungen der Proben vorzubeugen.

Die Organe beziehungsweise Organproben wurden unverzüglich nach der Entnahme beim PCR Projekt in mit PBS gefüllte 2ml Eppendorf cups gegeben und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Bei den anderen Projekten wurden die Proben am selben Tag direkt weiterverarbeitet und daher in auf Eis stehende und mit PBS (Gibco®) gefüllte 15ml Schraubdeckelröhren gegeben.

20.2.4 PCR

Für die Untersuchung wurden Ratten wie oben beschrieben sezirt und folgende Organproben entnommen:

- Gehirn
- Lymphknoten
- Knochenmark (Femur)
- Blut
- Muskel
- Aortenbogen
- Herz
- Schilddrüse
- Rückenmark (RM)
- Milz
- Thymus
- Niere
- Pankreas
- Ovar
- Lunge
- Leber

Die Organproben wurden in Eppendorf cups mit PBS gelagert, die in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und anschließend tiefgefroren wurden.

20.2.4.1 Gewinnung des Knochenmarks

Die Femurkondylen und der Femurkopf wurden abgetrennt, so dass lediglich die Diaphyse übrig bleibt und ein Zugang zur Markhöhle besteht.

Die Diaphyse wurde mit PBS durchspült und der Durchlauf aufgefangen, um das Knochenmark zu gewinnen. Dieser Vorgang wurde mehrere Male wiederholt, wobei zum Durchspülen immer der Durchlauf vom vorhergehenden Schritt verwendet wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15ml Schraubdeckelröhrchen überführt und sieben Minuten bei 1300 Umdrehungen pro Minute und vier Grad Celsius zentrifugiert (Haereus Zentrifuge). Der Überstand wurde entfernt, die Zellen durch Vortexen aufgelockert und mit 5ml ACK-Lysepuffer versetzt. Innerhalb von fünf Minuten lysieren die Erythrozyten; die Lymphozyten sind noch vital. Danach wurden sieben Milliliter PBS zugegeben, und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abgegossen und die Zellen aufgelockert, anschließend wurden das Schraubdeckelröhrchen mit zwei Millilitern PBS aufgefüllt. Die Suspension wurde dann durch ein 70µm Zellsieb in ein 50ml Schraubdeckelröhrchen überführt.

20.2.4.2 Zubereitung des Blutes

Dem Blut (in einem 50 ml Falcon Tube) wurde zur Lyse der Erythrozyten ebenfalls 10ml ACK-Lysepuffer zugegeben, danach wurde bis auf 50ml mit PBS aufgefüllt und bei 1500rpm (rotations per minute) und 4 Grad Celsius 5 Minuten zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand verworfen, der Bodenstand mit einem Vortex Gerät aufgelockert, erneut mit 20ml PBS aufgefüllt, und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wird nun auf 1ml Endvolumen aufgefüllt und schließlich durch das Zellsieb gelassen und in ein 2ml Eppendorf cup gebracht.

20.2.4.3 Auszählen der Lymphozyten in Knochenmark und Blut

Aus jeder Lösung werden 10µl entnommen und mit 10µl Tryptan Blau im Verhältnis 1:1 in einer 96 Wellplatte mit rundem Boden gemischt. Das Tryptan Blau markiert abgestorbene Lymphozyten dunkelblau. Mit der Neubauer-Zählkammer (0,100mm; 0,0025mm²) werden jeweils 2 Lösungen bei 20-facher Vergrößerung bei 660nm im Auflicht-Mikroskop ausgezählt.

Das Auszählen der Lymphozyten ist wichtig, da durch entsprechende Verdünnung eine einheitliche Zellzahl in allen Reaktionsansätzen erzielt werden muss.

Die Zubereitung der mRNA erfolgt mit dem RNEasy Kit von Qiagen®.

Dieses Kit beinhaltet Eppendorf cups, Puffer und auch spezielle Säulen mit einem Filter, in dem die DANN ausfiltriert wird.

Die Anwendung des Rneasy Kits erfolgt schrittweise nach folgendem Schema, hier an der Zubereitung des Knochenmarks geschildert:

1. Jedem Pellet der Knochenmarkszellen wird eine Mischung aus 600µl RLT-Puffer + 10µl β-ME zugegeben.
2. Die Proben werden mit dem Vortexgerät sowie durch wiederholtes aufziehen und abdrücken mit einer 1ml Spritze und 20G Kanüle möglichst gut mit dem Puffer vermischt; durch die Scherkräfte werden Zellen zum Platzen gebracht.
3. Jeder Probe werden 600µl 70%iger EtOH zugegeben, wobei die Mischung mit dem Puffer durch mehrmaliges Aufziehen der Pipette erzielt wird und nicht mit dem Vortex-Gerät. Das Ethanol dient zum Ausfällen der Nukleinsäuren.
4. Auf jede Säule werden 700µl der jeweiligen Probe gegeben und danach für 15s mit 10000 Umdrehungen (rpm) zentrifugiert.

Die Flüssigkeit, die sich in dem unteren Teil gesammelt hat wird weggeschüttet. Dieser Schritt wird mit den restlichen Proben wiederholt.

Nun werden die Proben in mehreren Schritten gereinigt:

Im ersten Waschschrift werden 350µl RW1 Puffer auf die Säulen gegeben und 15 Sekunden bei 10000 rpm (rotations per minute) zentrifugiert. Wieder wird der sich angesammelte Teil im Tube weggeschüttet. Jedes Tube wird durch ein Neues ersetzt. Anschließend wird die Dnase 1 Digestion zubereitet und zugegeben: 10µl Dnase und 70µl RDD Puffer werden je Probe angemischt. Jeder Probe werden 75µl DNase-Mix zugegeben. Dabei wird darauf geachtet, dass die Mischung besonders an der Säulen Matrix (die Kante zwischen Filter und Wand) gegeben wird und nicht auf den Filter oder die Wand. Dies wird bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert.

Es folgt die Zugabe der DNase, denn es soll lediglich RNA isoliert werden. RNA zeigt an, was die Zelle im Moment des Todes translatieren wollte.

Im folgenden zweiten Waschschrift werden 350µl RW1 Puffer auf die Säulen gegeben und für 15 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert. Der Inhalt der Tubes wird wieder weggeschüttet.

Der dritte Waschschrift besteht daraus, 500µl RPE Puffer auf die Säulen zu geben und ebenfalls für 15 Sekunden bei 10000rpm zu zentrifugieren. Der Inhalt der Tubes wird wieder verworfen.

Jetzt wird der zweite Waschschrift wiederholt, jedoch wird 2 Minuten auf maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit zentrifugiert bis die Säulen trocken sind.

Die Tubes werden weggeworfen und die Säulen jeweils in ein neues, sauberes 1,5ml-Tube gebracht.

Auf jede Säule kommen jetzt 100µl RNase-freies (=DEPC-) Wasser. Die Säulen mit den Tubes werden 1 Minute mit 10000rpm zentrifugiert.

Die Säulen werden jetzt weggeworfen und übrig bleibt die RNA gelöst in DEPC-H₂O.

Nun hat man aus jeder Probe RNA gewonnen.

Diese Schritte werden jetzt mit den Blutproben wiederholt, damit am Ende RNA des Knochenmarkes und des Blutes hergestellt sind.

20.2.5 Methode: FACS (fluorescence-activated cell sorting)

Für die Untersuchung wurden Ratten in wie oben beschrieben sezirt und folgende Organproben entnommen:

- ZNS (Gehirn + Rückenmark)
- Lymphknoten
- Blut

Im Gegensatz zur PCR-Präparation wurden die Organproben in Eppendorf cups mit PBS gelagert, auf Eis gestellt und direkt nach Entnahme weiterverarbeitet und nicht in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Bei der Vorbereitung der Zellen für die Durchflußzytometrie ist es entscheidend, die Zellen optimal zu kühlen und lediglich kurz für die Bearbeitung vom Eis zu nehmen, da mit dieser Methode nur vitale Zellen nachgewiesen werden.

Bei der Bearbeitung wurde genau darauf geachtet, die Zellen unter optimalen Bedingungen zu bearbeiten.

20.2.5.1 Aufarbeitung Lymphknoten

Bei der Aufarbeitung wird zunächst das PBS, welches zur Zwischenlagerung dient, verworfen. Die Lymphknoten werden direkt in ein kleines Sieb gegeben; eine Petrischale wird mit etwa 10ml PBS gefüllt. Anschließend werden die Lymphknoten mit Hilfe eines Spritzenstempels durch das Sieb gepresst. Bindegewebe und andere Anteile bleiben zum größten Teil im Sieb und werden verworfen.

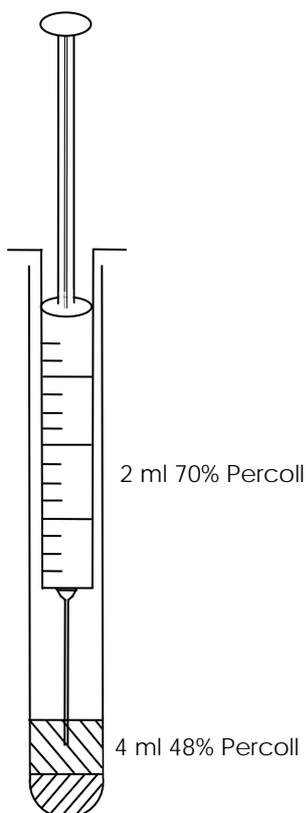
Die so gewonnenen Zellsuspension wird wieder in ein frisches 15ml Schraubdeckelröhrchen überführt und auf Eis gestellt, bis die Zentrifuge bereit ist.

Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 1400 Umdrehungen pro Minute bei 4°C für 6 Minuten.

Der Überstand wird verworfen, das sich am Boden absetzende Pellet wird in 3 ml PBS resuspendiert und durch Rütteln wieder vollständig in Lösung gebracht. Anschließend wird diese Suspension in ein 50 ml Schraubdeckelröhrchen gegeben, in welches ein Zellsieb eingesetzt ist.

Das Einwegsieb wird entsorgt, sobald die Zellsuspension durchgelaufen ist, dann wird das Röhrchen verschlossen und bis zum nächsten Arbeitsschritt wieder auf Eis gelagert.

20.2.5.2 Aufarbeitung ZNS:



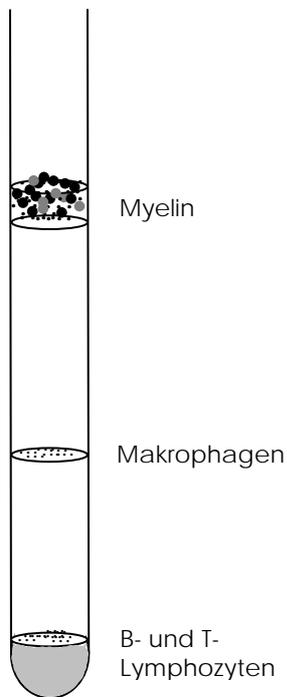
Gehirn und Rückenmark liegen in ca. 15ml PBS vor. Das PBS wird weggeschüttet und das Gewebe durch ein Sieb in 10ml DNase I Puffer mit Hilfe eines Spritzenstempels gepresst. Die Petrischale wird mit weiteren 5ml DNase I Puffer ausgespült. 10ml DNase I Puffer + ZNS sowie die 5ml DNase I Puffer werden in einem 50ml Falcon Tube gesammelt und 10 Minuten bei 1500rpm bei 4°C zentrifugiert.

Zubereitung des Gradienten in einem 15ml Falcon Tube:

Unter 4ml 45%iges Percoll werden mit einer 2ml Spritze unter großer Vorsicht 2ml 70% Percoll gebracht.

Das fertig zentrifugierte Zellpellet wird in 6ml 30%igem Percoll gelöst und ebenfalls sehr vorsichtig auf den Gradienten gebracht.

Abb. 5 Herstellung des Percoll-Gradienten



Nun wird ohne Bremse 25 Minuten bei 2300rpm bei 4°C zentrifugiert. Daraufhin wird das sich oben angesammelte Myelin mit einer Spritze entfernt und die Fraktionen an der 30%/45% und 45%/70% Grenze gesammelt.

Diese Zellen werden mit PBS gewaschen, der Überstand abgeschüttet und die Zellen in 2ml ACK-Puffer für 1,5 Minuten lysiert. Danach aufgefüllt mit PBS, erneut gewaschen, und mit FACS Puffer aufgefüllt.

Abb. 6 Percoll-Gradient nach Beladung und Zentrifugation

Da mit bekannter MS Pathologie sehr wenige Lymphozyten im Gehirn zu erwarten sind, wir gepoolt, d.h. Gewebe von Tieren mit gleichem Stamm und ähnlichem Krankheitsverlauf werden gemeinsam weiterverarbeitet und gemessen.

Da das FACS Gerät durch schon kleine Gewebeteile verstopft, werden die Lösungen mit einem Nylon Filter gefiltert.

20.2.5.3 Aufarbeitung des Blutes

Dem Tier wurde Blut mit einer EDTA Spritze entnommen und in ein 50ml Falcon Tube übergeführt. 8ml ACK Puffer werden hinzu gegeben und kurz gevortext. Nach 5 Minuten sind Erythrozyten lysiert und es wird mit PBS aufgefüllt. Nach Zentrifugation wird der Überstand abgeschüttet und der Waschvorgang wiederholt. Nachdem auf jede Probe 500µl FACS Puffer gegeben wurden, werden entsprechende Proben gepoolt.

Nun erfolgt wieder das Auszählen unter dem Auflichtmikroskop mit Trypanblau-Färbung: Jeder Probe werden 10µl entnommen, in eine Vertiefung einer 96-Loch-Probenplatte gegeben, und jeweils mit 10µl Trypanblau vermischt und anschließend in der Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Jedes Schraubdeckelröhrchen sollte 10 Millionen Zellen pro Milliliter Suspension enthalten, entsprechend dieser Maßnahme wurde verdünnt. Falls es nicht möglich ist, auf die entsprechende Zellzahl zu kommen, sollten jedoch mindestens 5 Millionen Zellen pro Milliliter Suspension angestrebt werden.

Der Zellsuspension werden nun pro zu detektierendem Antikörper 100µl entnommen und mit jeweils 10µl pro entnommenen 100µl Fc-Block purified anti-rat versetzt.

Anschließend werden dieser Suspension 90µl entnommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Dieser werden 10µl der entsprechenden Antikörperlösung zugefügt, gevortext und im Kühlschrank bei 4°C für 30 Minuten inkubiert.

Für jede neue Probe wird dieses Setting durchlaufen.

Der FACS-Scan erfolgt an einem AppliedBiosystems 7200 System.

20.2.6 Methode: MACS (magnetic-activated cell separation)

Für die Untersuchung wurden Ratten in wie oben beschrieben sezirt und folgende Organproben entnommen:

- ZNS (Gehirn + Rückenmark)
- Lymphknoten
- Blut
- Milz

Die Zubereitung der Zellen für die MACS-Analytik erfolgt bis zu einem gewissen Maße analog der FACS-Zubereitung. Die Aufbereitung der Milz erfolgt analog zu derer der Lymphknoten.

Ab der Zellauszählung wird allerdings anders verfahren:

Die Zellsuspension wird mit 300g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vollständig vorsichtig abpipetiert. Das Zellpellet wird in je 80µl MACS-Puffer pro Milliarde Zellen resuspendiert. Je Milliarde Zellen werden dann 20µl die gegen die gesuchten Oberflächenantigene gerichteten MicroBeads zugegeben.

Nach gutem Mischen werden die Proben 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach dieser Zeit werden Antikörper zur Färbung zugegeben und wieder 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen gewaschen, indem man das Pellet in 2 ml MACS-Puffer je Milliarde Zellen bei 300g für zehn Minuten zentrifugiert und anschließend den Überstand abpipetiert.

Zur magnetischen Trennung werden die Zellen in 500µl MACS-Puffer je 10 Milliarden Zellen resuspendiert.

Die magnetische Separation erfolgt nach dem Hersteller-Protokoll von Miltenyi Biotec®.

21 Ergebnisse

21.1 Ergebnisse des PCR-Projekts

Es wurde die Expression von CXCR4 und SDF1 sowohl in der Peripherie als auch im zentralen Nervensystem untersucht. Diese Untersuchungen wurden an den zwei verschiedenen Ratten-Stämmen DA und ACI durchgeführt.

Die unterschiedliche Suszeptibilität der Stämme DA und ACI ist schon seit längerem bekannt (Weissert 1998). Wir untersuchten nun, inwiefern diese Beobachtung mit der Expression von CXCR4 und seinem Liganden SDF1 abhängig ist, ob überhaupt ein Zusammenhang besteht und wenn ja, wie dieser aussieht.

Weiterhin interessierte uns nicht nur der Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsgrad und der Stammzugehörigkeit, sondern auch die Auswirkung der verschiedenen Immunisierungen auf die Erkrankung in den einzelnen Stämmen.

Dabei wurden wie oben beschrieben die verschiedenen Immunisierungen Naiv, IFA, IFA+MOG, CFA und CFA+MOG verwendet. Die Tiere wurden mit der oben beschriebenen Methode immunisiert und anschließend 14 Tage lang klinisch untersucht. Die Expression von CXCR4 und SDF1 wurde mittels PCR auf Applied Biosystems ABI PRISM 7000 Sequence Detection System als Real Time PCR ausgeführt.

Als endogene Kontrolle diente hier die Expression des house keeping gene für die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase(GAPDH), welches das Schlüsselenzym des Pentosephosphatweges darstellt.

Mit dieser endogenen Kontrolle konnte garantiert werden, dass eine Normalisierung auf unterschiedliche mRNA/ cDNA-Mengen stattfand.

Als weitere endogene Kontrolle wurde ein weiteres house keeping gene, 18S rRNA, herangezogen.

Diesen beiden Kontrollen eignen sich besonders, da ihre Expression in den Ratten konstant ist.

Bei den DA Ratten konnte eindrücklich gezeigt werden, dass die Immunisierung mit vollständigem Freundschem Adjuvans (CFA) und vollständigem Freundschem Adjuvans zusammen mit Myelin Oligodendrozyten Glykoproteine (CFA+MOG) eine deutliche Steigerung der Expression von CXCR4 und SDF1 induziert:

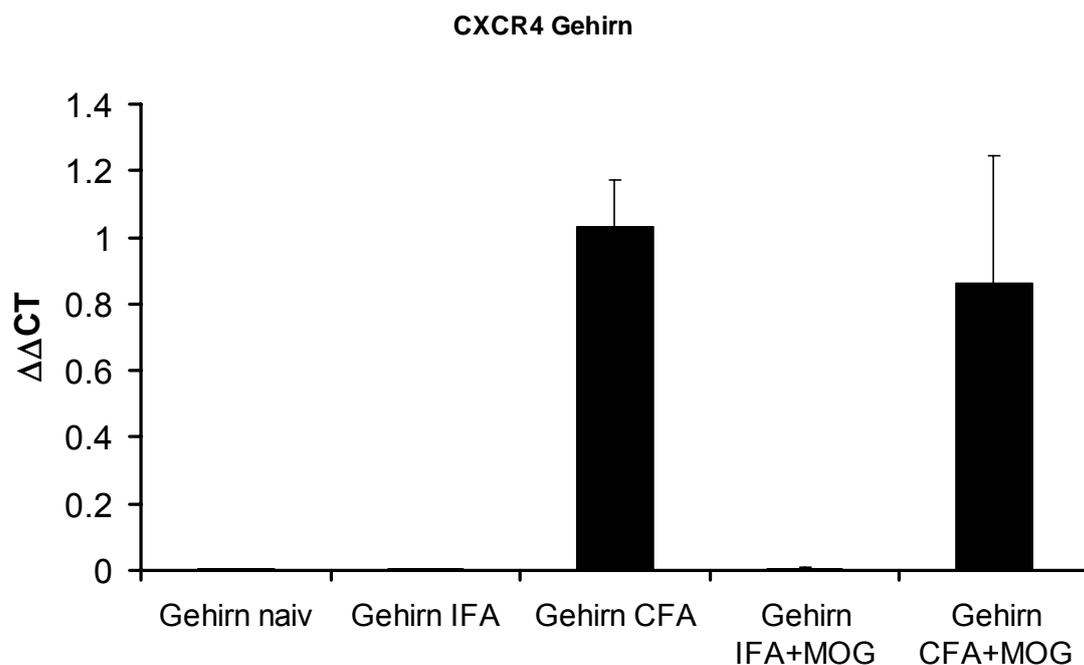


Abb.7 Relative Expression von CXCR4 im Gehirn bei DA-Ratten

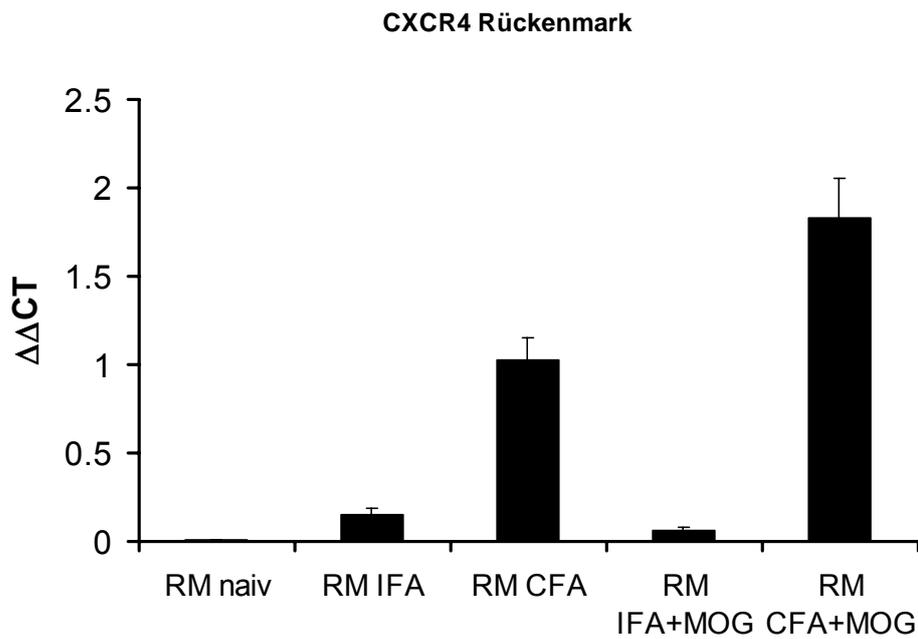


Abb. 8 Relative Expression von CXCR4 im Rückenmark bei DA-Ratten.

Die Expression von SDF1 als Ligand von CXCR4 war bei den DA-Ratten in der CFA und CFA+MOG-Immunsierung ebenfalls im ZNS deutlich erhöht (Abb. 9 und 10):

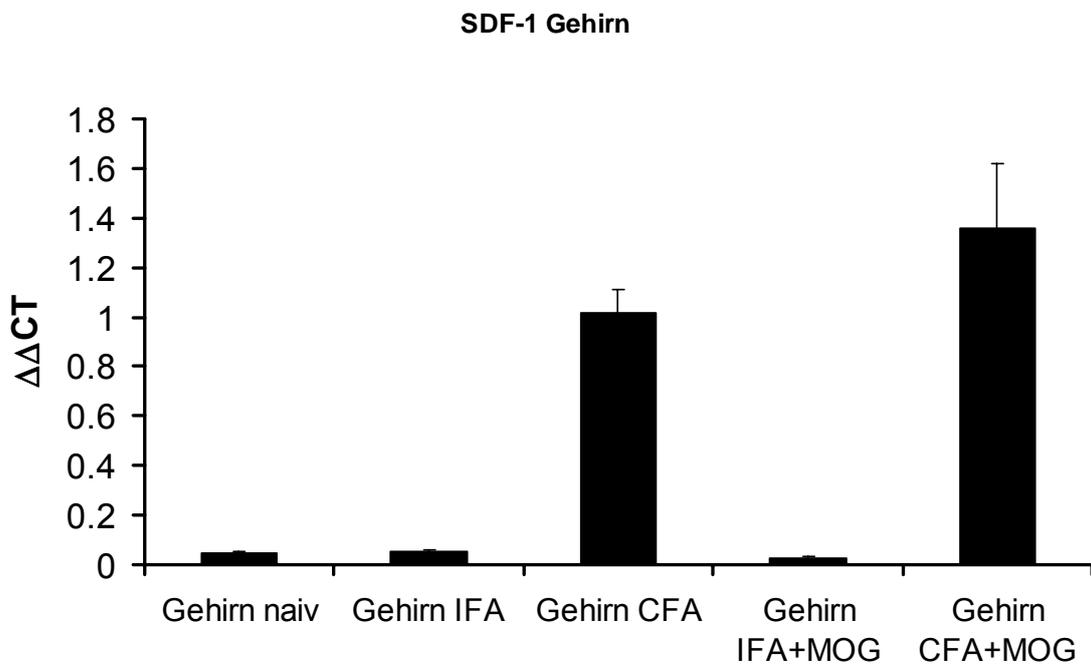


Abb. 9 Relative Expression von SDF1 im Gehirn bei DA-Ratten.

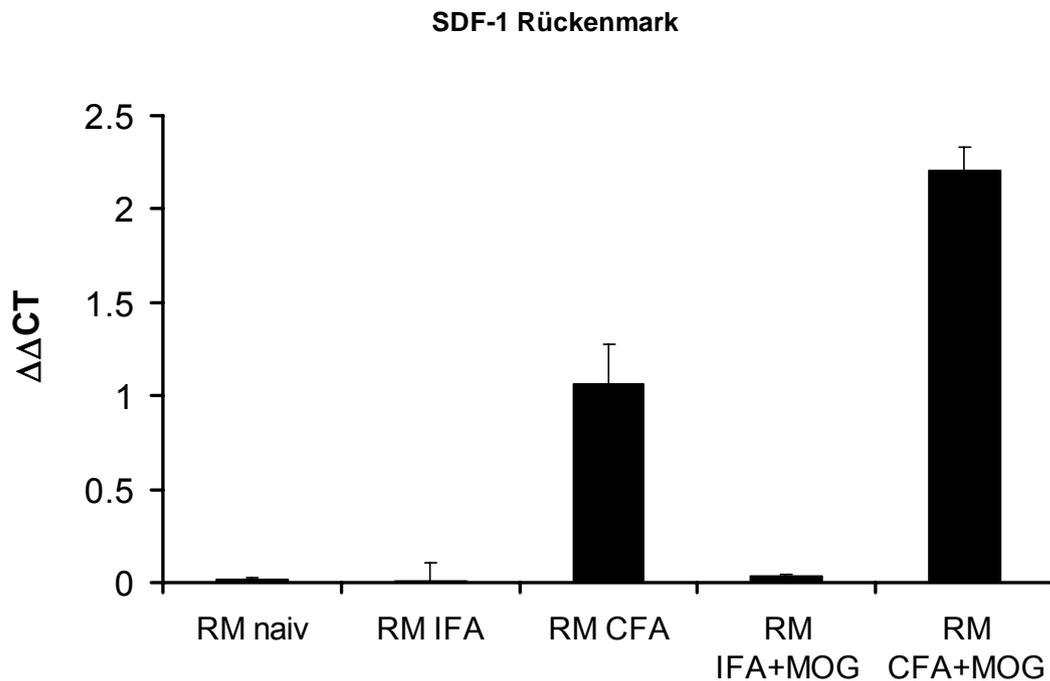


Abb. 10 Relative Expression von SDF1 im Rückenmark bei DA-Ratten.

In der Peripherie zeigte sich ein diffuseres Verteilungsmuster der Expression: In dem sekundärlymphatischen Organ Milz (siehe Abb. 11) ähnelt das Expressionsmuster von CXCR4 stark dem Expressionsmuster des ZNS, wohingegen die Expression von CXCR4 im Lymphknoten, ebenfalls ein sekundäres lymphatisches Organ, ein umgekehrtes Expressionsmuster mit den niedrigsten relativen Expressionen von CXCR4 in den Immunisierungen CFA und CFA+MOG, zeigt (ABB. 12).

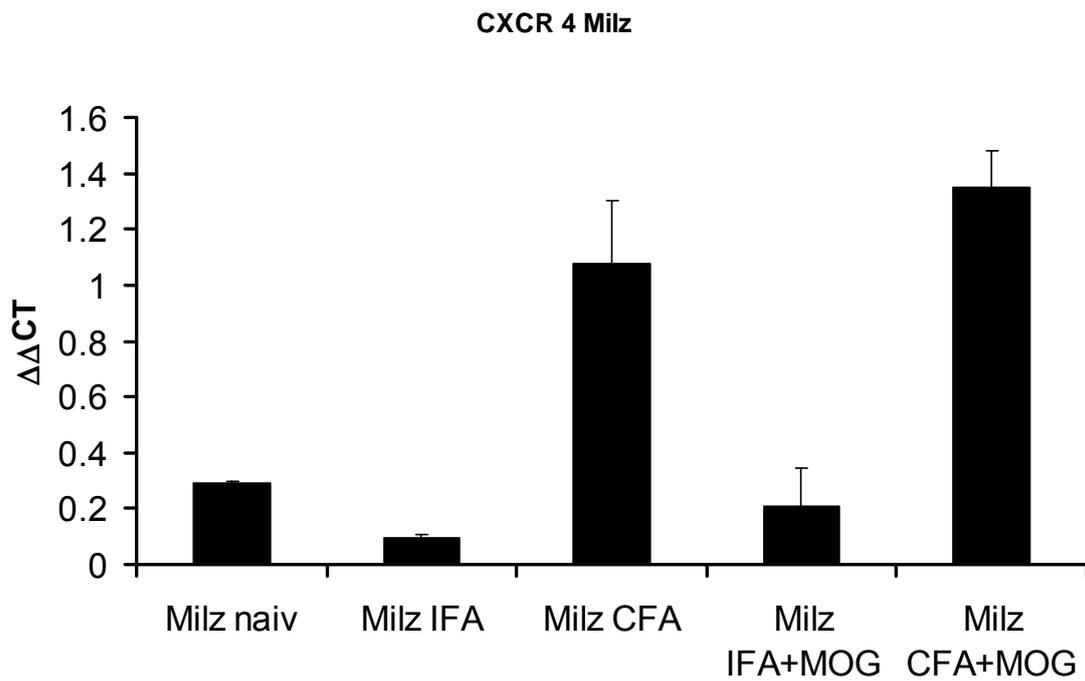


Abb. 11 Relative Expression von CXCR4 in der Milz bei DA-Ratten.

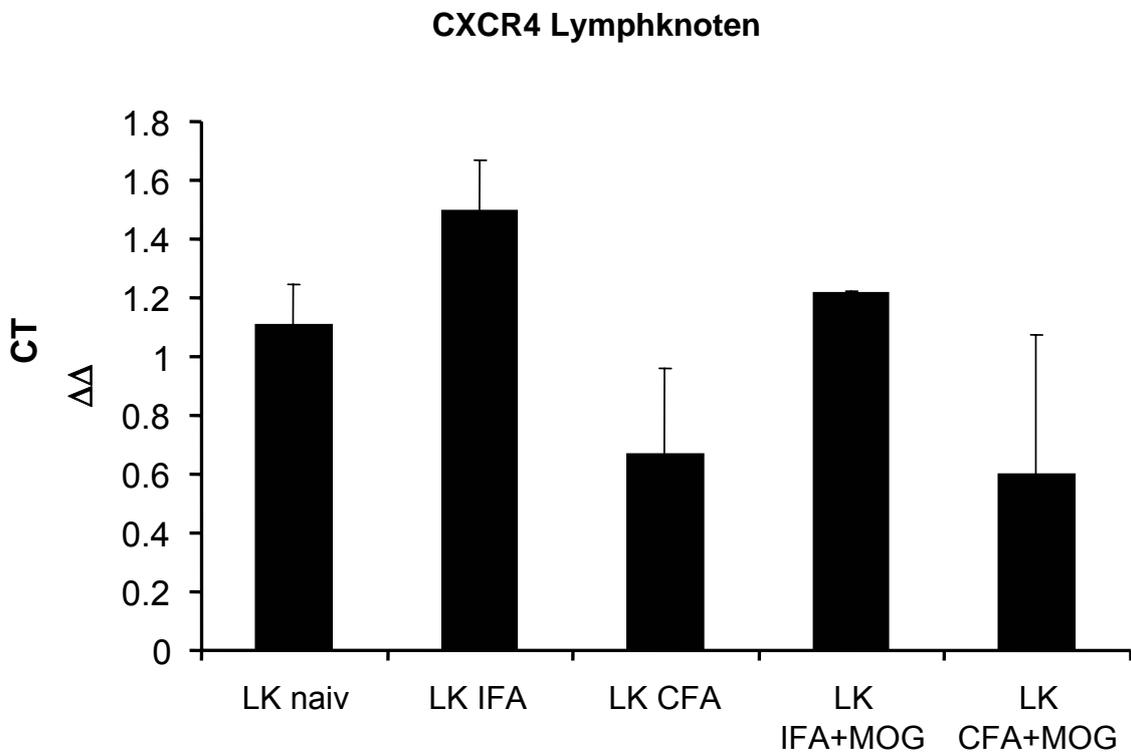


Abb. 12 Relative Expression von CXCR4 in Lymphknoten bei DA-Ratten.

Bei der relativen Expression von SDF1 in der Peripherie ergab sich folgende Verteilung:

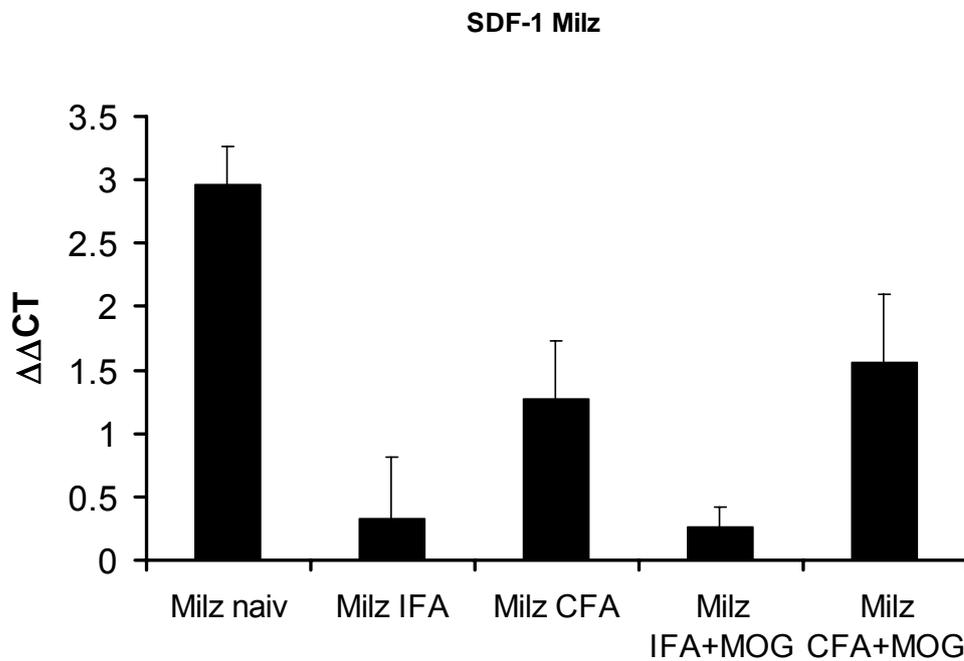


Abb. 13 Relative Expression von SDF1 in der Milz bei DA-Ratten.

Auffällig ist die Expressionsverteilung sowohl von CXCR4 als auch SDF1 im Blut der erkrankten DA-Ratten und den Kontrolltieren. Hier ist die stärkste Expression bei den CFA-immunisierten Tieren zu finden (Abb. 14 und 15):

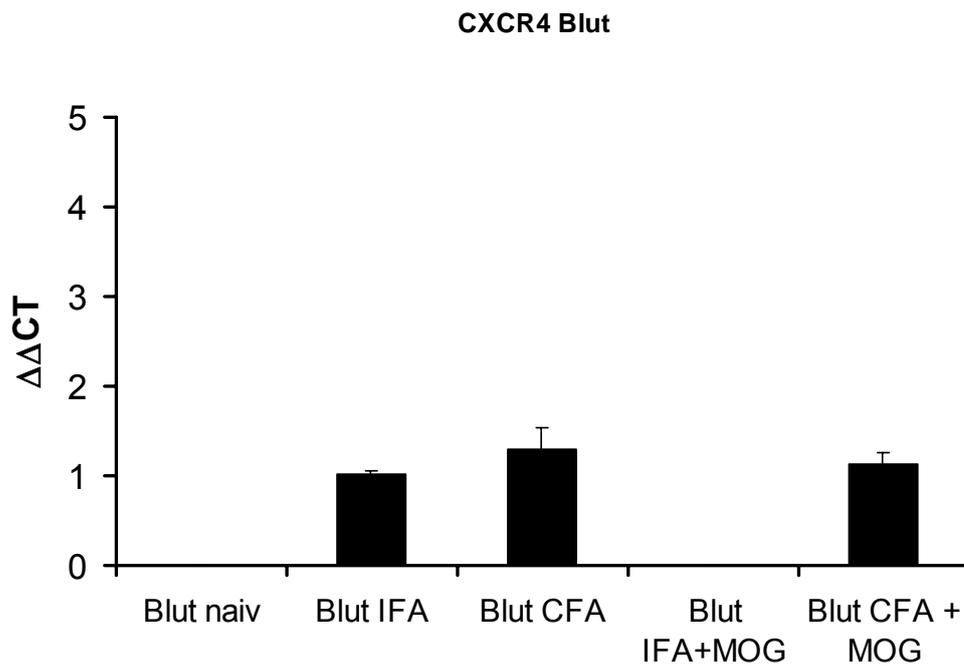


Abb. 14 Relative Expression von CXCR4 im Blut bei DA-Ratten.

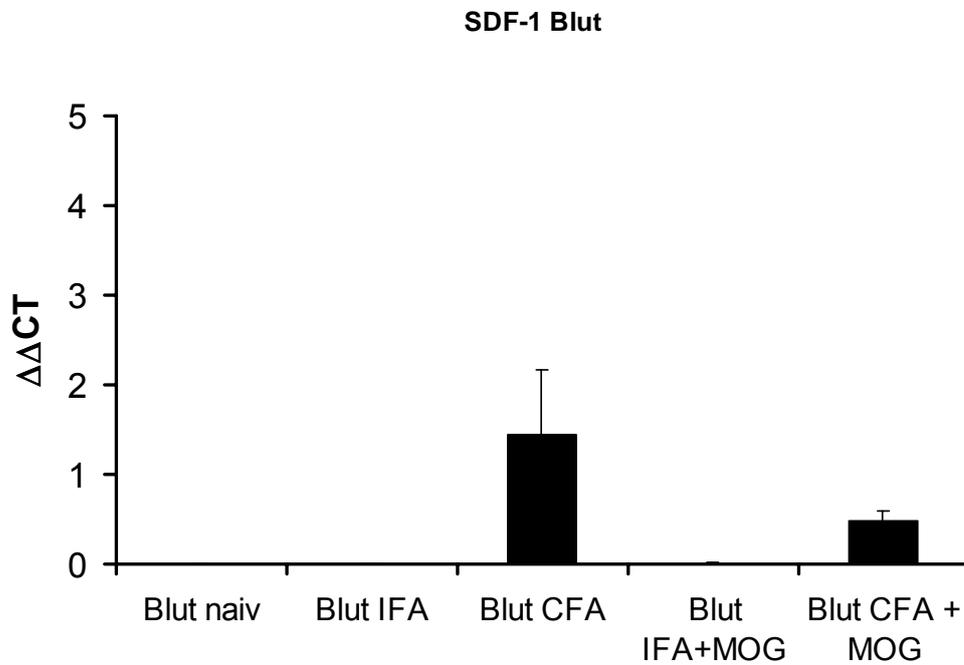


Abb. 15 Relative Expression von SDF1 im Blut bei DA-Ratten.

Bei den ACI-Ratten ist das Expressionsmuster im zentralen Nervensystem in gewissem Maße dem Expressionsmuster der DA-Ratten vergleichbar, da auch hier die Expression von CXCR4 und SDF1 bei den CFA sowie den CFA+MOG immunisierten Tieren am größten ist (Abb. 16 und 17).

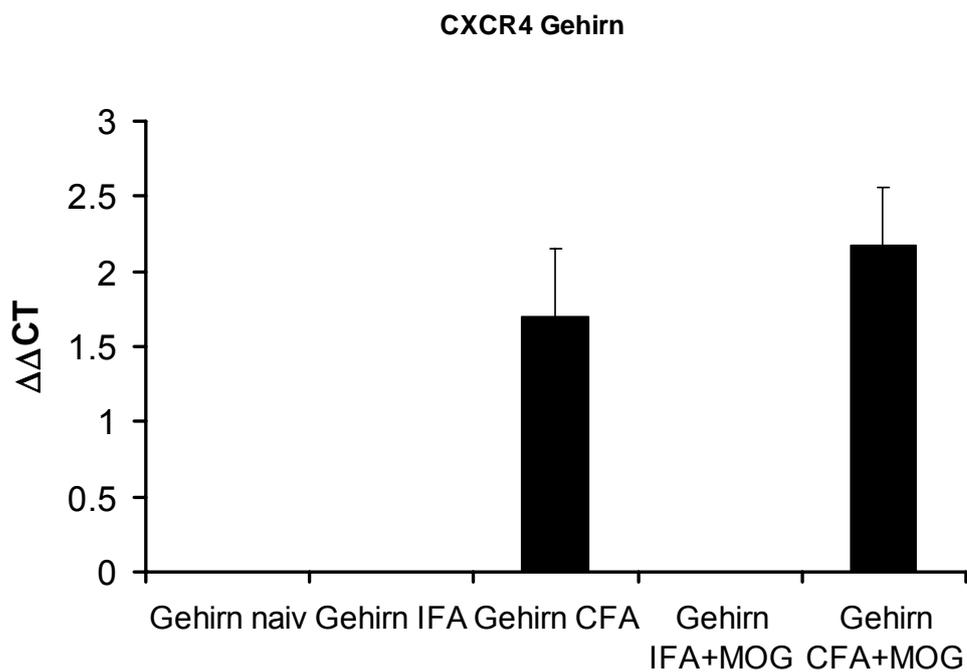


Abb. 16 Relative Expression von CXCR4 im Gehirn bei ACI-Ratten.

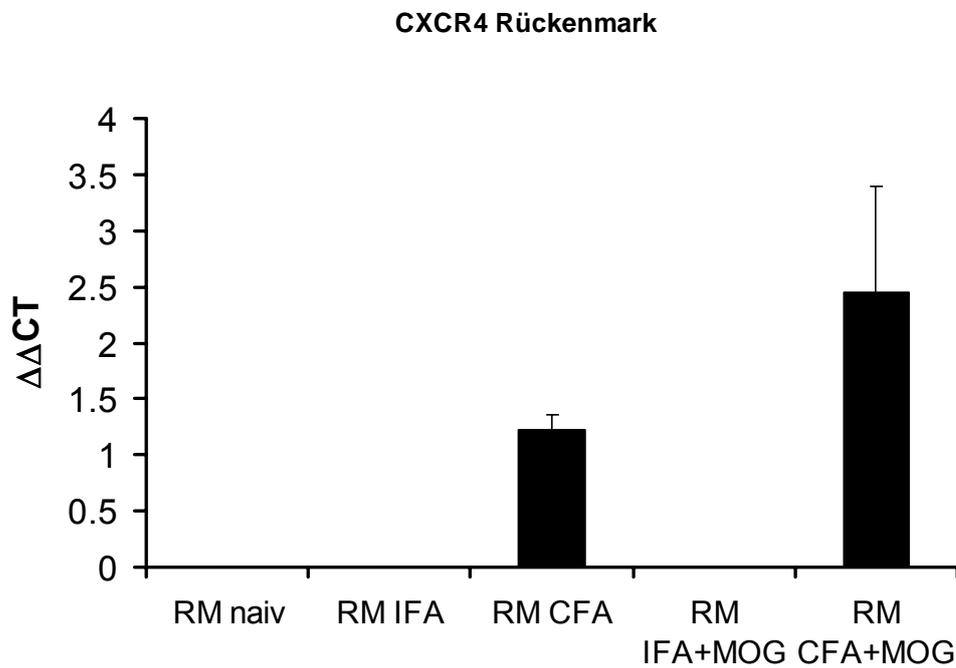


Abb. 17 Relative Expression von CXCR4 im Rückenmark bei ACI-Ratten.

In der Peripherie ist die Ähnlichkeit zwischen der CXCR4-Expression in DA-Ratten und ACI-Ratten noch schwach ausgeprägt, am ähnlichsten sind sich die Expressionsmuster in den beiden Stämmen in der Milz (Abb. 11, Abb. 18 und Abb. 19):

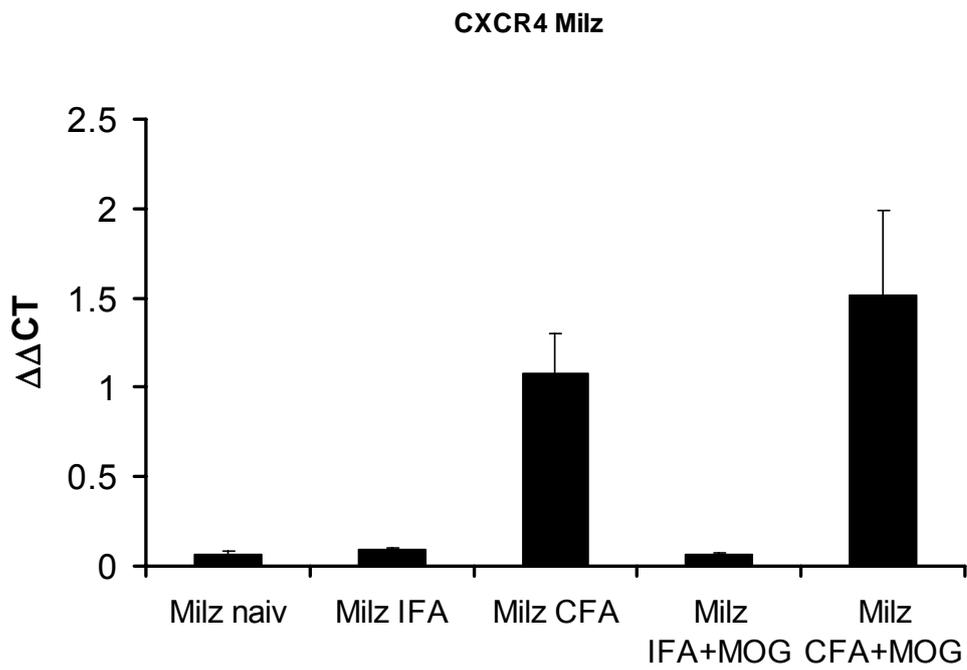


Abb. 18 Relative Expression von CXCR4 in der Milz bei ACI-Ratten.

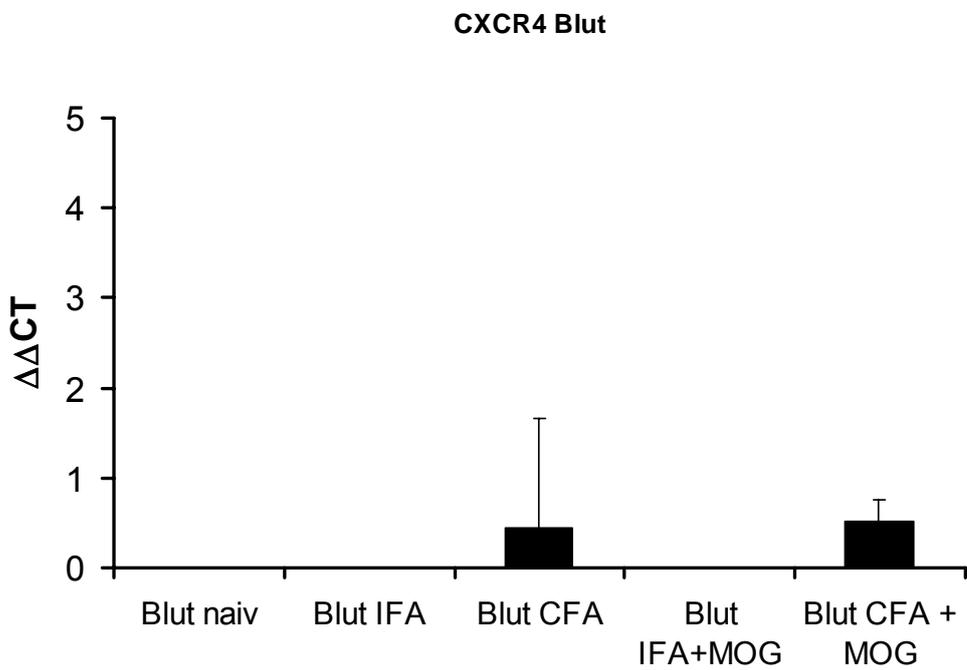


Abb. 19 Relative Expression von CXCR4 im peripheren Blut bei ACI-Ratten.

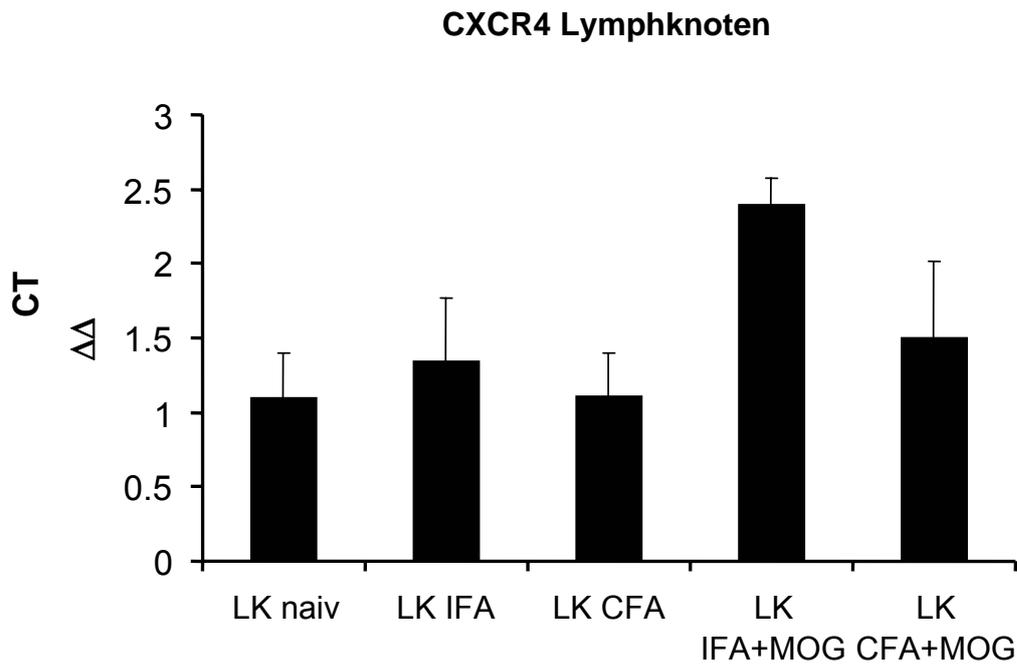


Abb. 20 Relative Expression von CXCR4 in Lymphknoten bei ACI-Ratten.

Gleiches gilt auch für die relative Expression von SDF1: Im zentralen Nervensystem ist die relative Expression wie bei den DA-Ratten bei den CFA und CFA+MOG-Immunsierungen am höchsten (Abb. 21 und Abb.22).

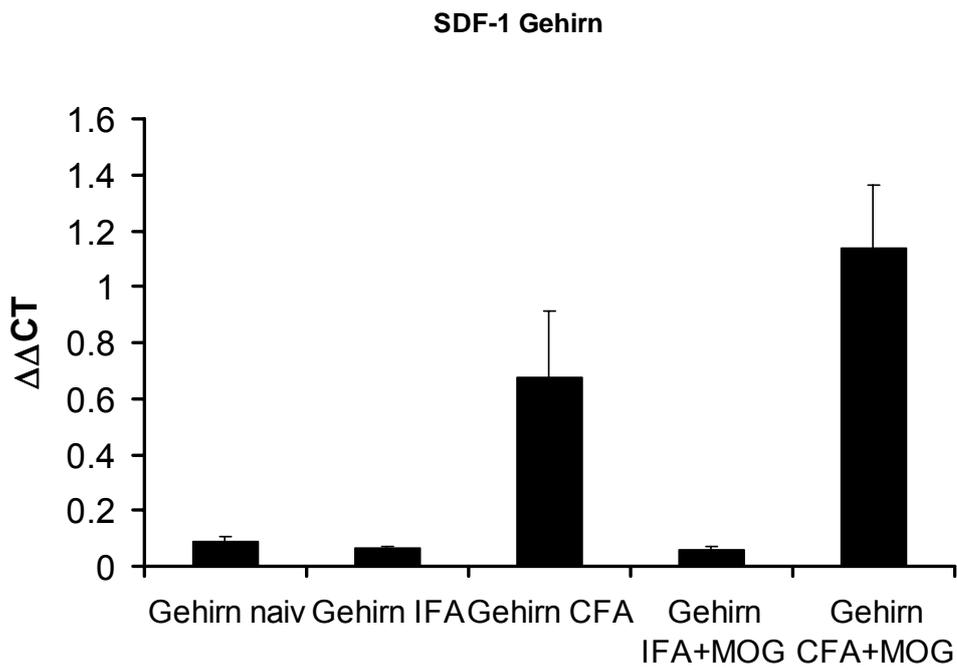


Abb. 21 Relative Expression von SDF1 im Gehirn bei ACI-Ratten

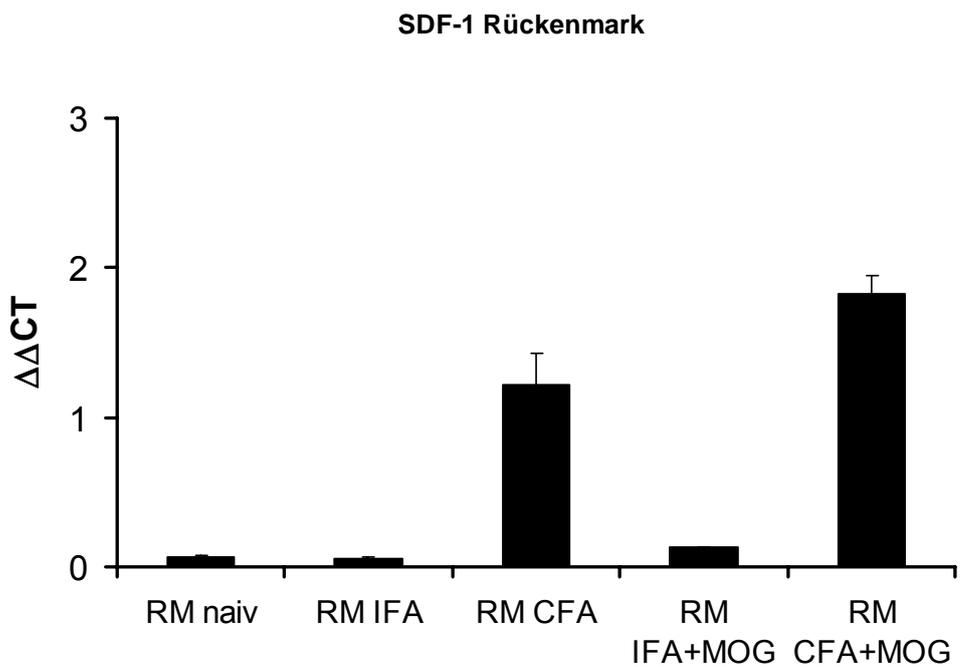


Abb. 22 Relative Expression von SDF1 im Rückenmark bei ACI-Ratten.

Auch in den lymphatischen Organen Milz und Lymphknoten ist die Expression von SDF1 bei ACI-Ratten sehr gut mit der bei DA-Ratten vergleichbar.

Die einzige Ausnahme stellt hier die Expression von CXCR4-positiven Zellen im Blut dar, hier gibt es eine enorme Vermehrung der CXCR4-Expression in den Immunisierungen IFA und IFA+MOG (Abb. 23).

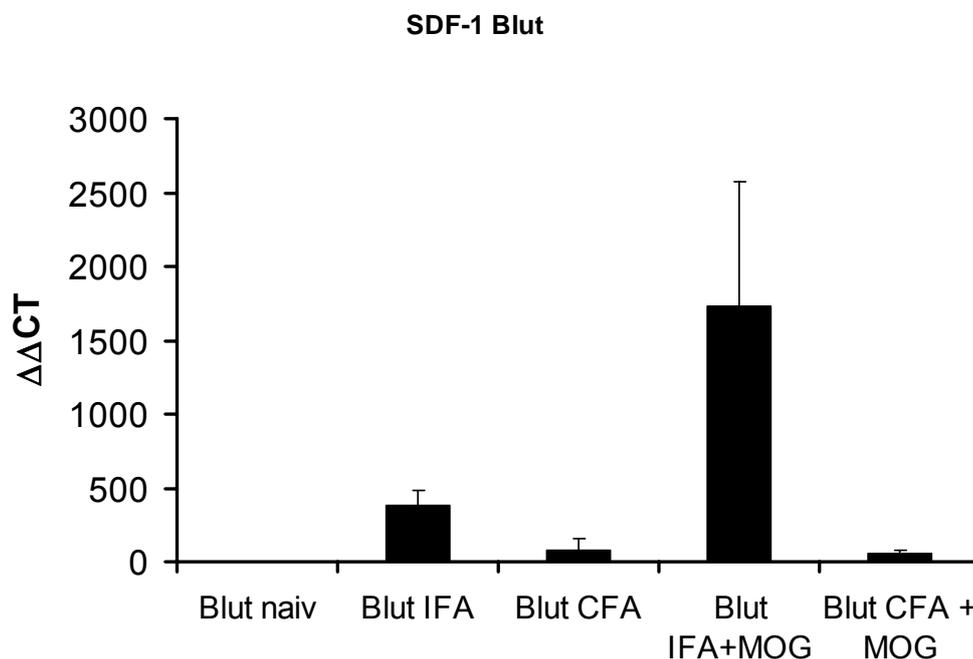


Abb. 23 Relative Expression von SDF1 im peripheren Blut bei ACI-Ratten.

Die relative Expression von SDF1 im peripheren Blut von ACI-Ratten ist bei den IFA+MOG immunisierten Ratten am stärksten ausgeprägt. Deutlich schwächer ist die SDF1 Expression bei IFA-immunisierten Tieren. Die Immunisierungen mit CFA und CFA+MOG weisen im peripheren Blut eine eher geringe Expression von SDF1 auf, bei den naiven Tieren lässt sich keine SDF1 Expression im peripheren Blut nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich ein Trend bei der relativen Expression von CXCR4 und SDF1 bei den untersuchten Immunisierungen erkennen, der dahin geht, dass bei den hochenzephalitogenen Immunisierungen die relative Expression in der Regel sowohl bei den DA als auch den ACI-Tieren gesteigert ist.

Was den klinischen Krankheitsverlauf beziehungsweise die Krankheitssuszeptibilität betrifft, so lässt sich sagen, dass ACI-Ratten nicht an der experimentellen autoimmunen Enzephalitis erkranken (Weissert et al. 1998; Dahlmann et al. 1999; Jagodik et al. 2004). Dies konnte bestätigt werden; der Erkrankungsverlauf bei beiden ACI-Stämmen zeigt kontinuierlich einen Score von 0 auf. Die DA-Tieren hingegen ließen eine der Zeit proportionale Verschlechterung erkennen. Diese Erkrankungsverläufe der Tiere bestätigen vorangehende Versuche bei denen nur DA-Ratten an EAE erkrankten, während ACI-Tiere keine klinischen Symptome der EAE zeigten.

Die Tiere wurden bis zum zwölften Tag post Immunisierung täglich morgens und abends gescored und schließlich an Tag zwölf seziert.

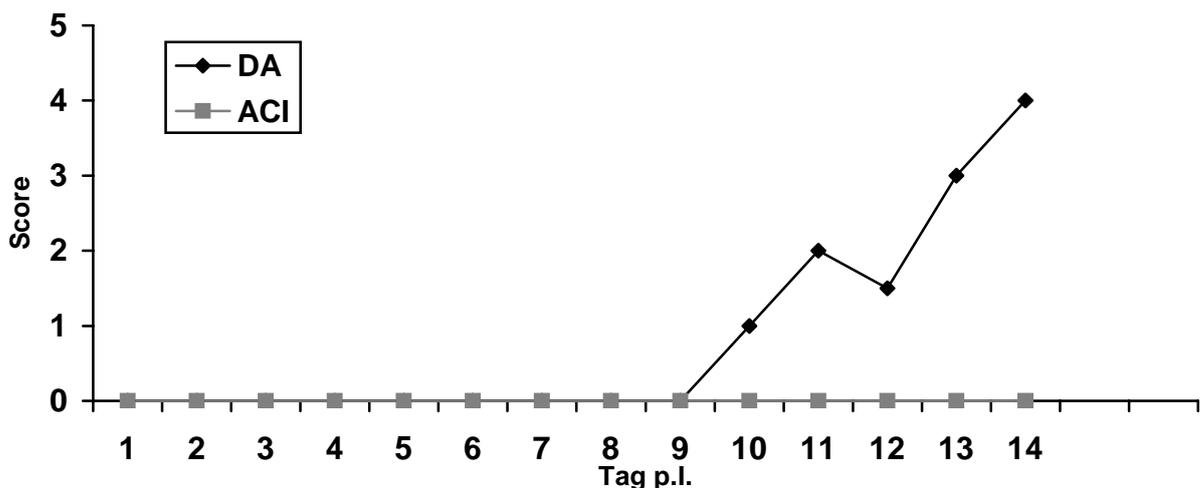


Abb. 24 Krankheitsverlauf bei ACI- und DA-Tieren

21.2 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wurden ausschließlich Gewebeproben von CFA + MOG1-125 immunisierten Tieren betrachtet.

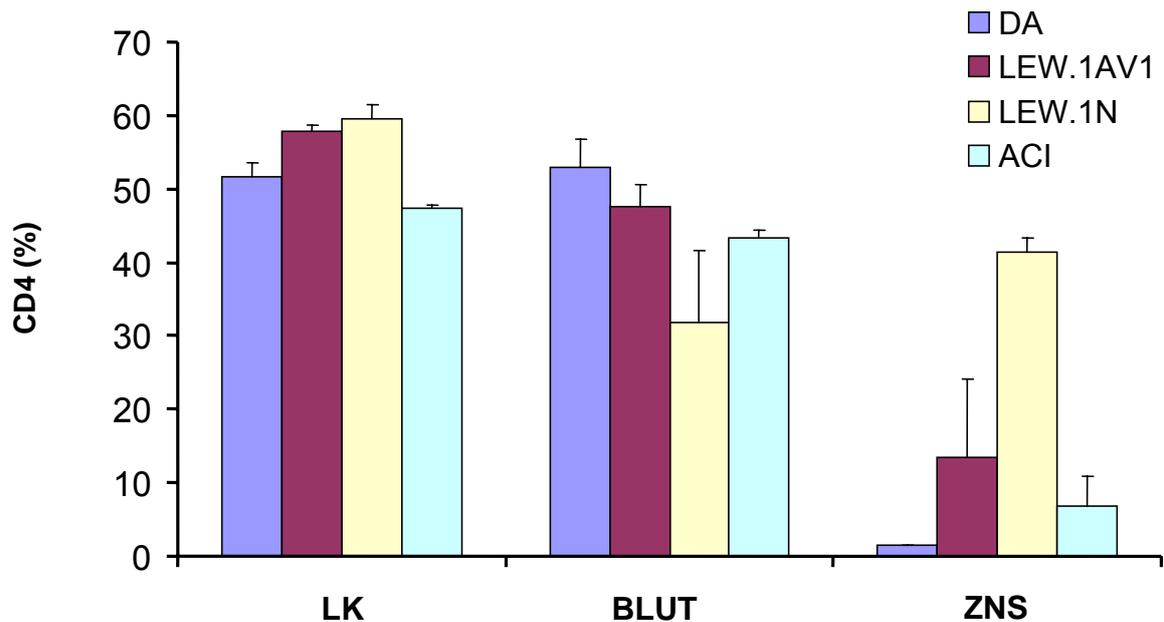


Abb. 25 Anteil von CD4+ Zellen im FACS-Scan

CD4 als Oberflächenantigen kommt v.a. bei T-Lymphozyten vor. CD4+ T-Zellen interagieren mit MHCII tragenden antigenpräsentierenden Zellen. Bei der Untersuchung auf CD4+ T-Lymphozyten fällt auf, dass diese bei allen immunisierten Tieren in erhöhtem Maße vorhanden sind, besonders in Lymphknoten und peripherem Blut. Besonders prominent ist die vermehrte Zahl an CD4+ T-Zellen bei den LEW.1N Tieren.

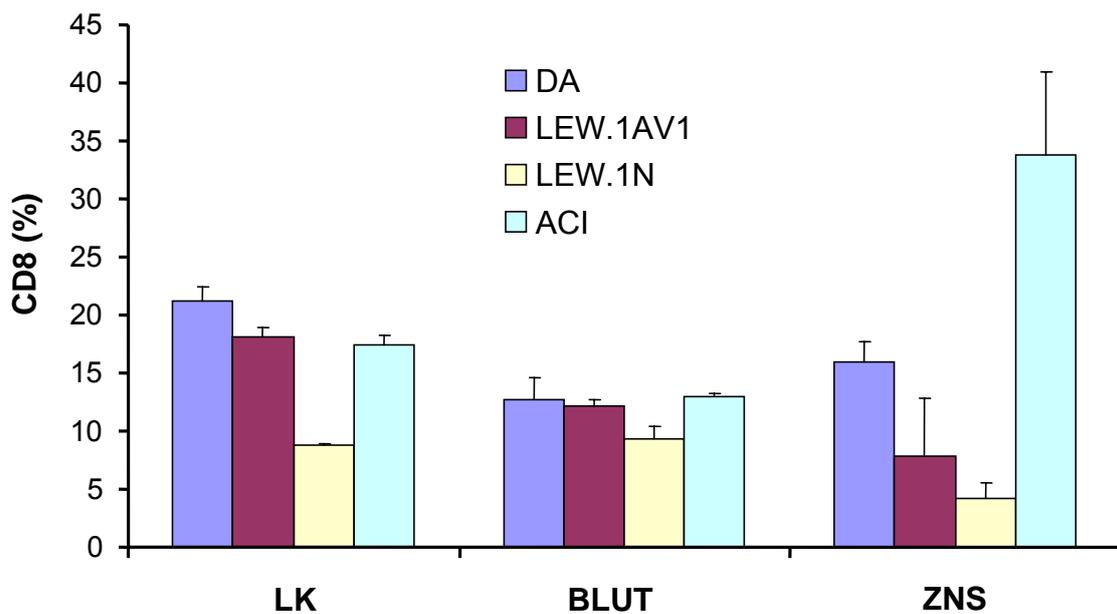


Abb. 26 Anteil CD8+ positiver Zellen im FACS-Scan

CD8+ T-Lymphozyten reagieren auf Antigene, die durch MHC I präsentiert werden. Diese T-Zellen kommen natürlicherweise praktisch überall im Körper vor. Nach der Immunisierung mit MOG1-125 + CFA steigt die Anzahl der CD8+-T-Lymphozyten bei allen vier Stämmen an, besonders im Lymphknotengewebe sowie im peripheren Blut. Im ZNS verhält sich die Expression beinahe antiproportional zum Krankheitsverlauf, hier erreichen ACI-Ratten die höchsten Werte, obwohl sie nicht an der EAE erkranken, wohingegen die LEW.1N-Tiere, die die stärkste Klinik entwickeln, die geringste CD8+-Lymphozytenzahl im ZNS aufweisen.

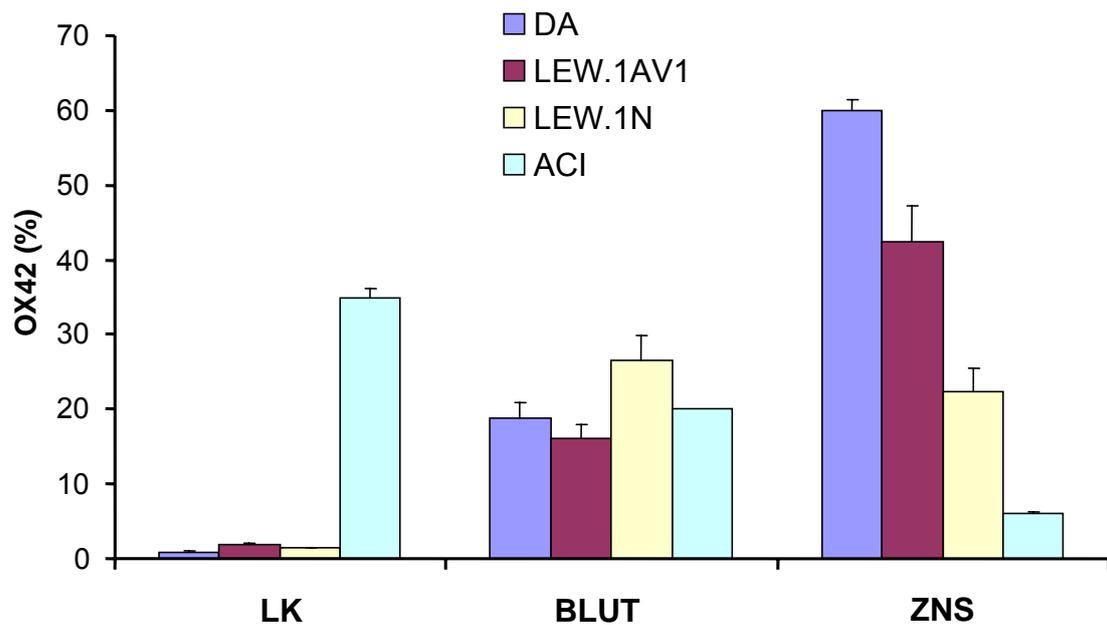


Abb. 27 Anteil Ox42-markierter Zellen im FACS-Scan

Ox42 ist ein gegen CD11b gerichteter Antikörper. CD 11b ist ein typisches Epitop auf Makrophagen. Somit kennzeichnet OX42 indirekt die Anzahl von Makrophagen in den jeweiligen Gewebeproben. Die Anzahl der Makrophagen post Immunisationem ist bei allen vier Stämmen im peripheren Blut als auch im zentralen Nervensystem erhöht. Die ACI-Tiere zeichnen sich durch eine erhöhte Makrophagenexpression in den Lymphknoten aus, wohingegen die Anzahl der Makrophagen verglichen mit den anderen Stämmen relativ gering ist.

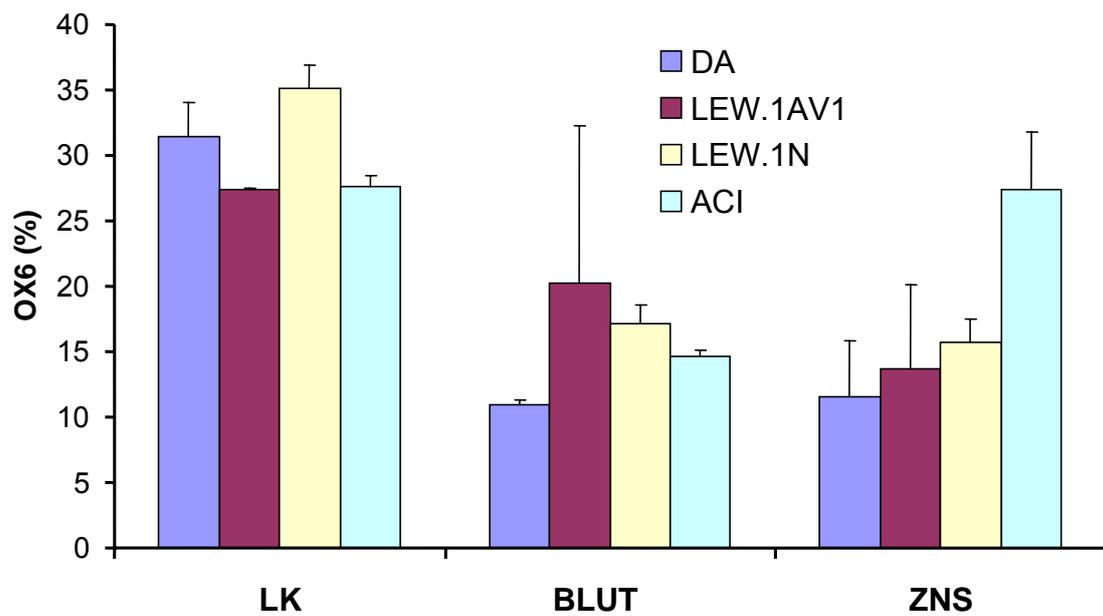


Abb. 28 Anteil Ox6 markierter Zellen im FACS-Scan

Als Marker für MHCII RT Ia kommt Ox6 zum Einsatz. MHCII kommt sowohl auf B-Zellen also auch auf Antigen präsentierenden Zellen (APC) vor und ist für die Interaktion mit CD4+ T-Zellen wichtig. (Muhallab 2005). B-Zellen werden sowohl in den Lymphknoten, der Peripherie und dem zentralen Nervensystem verstärkt gefunden und zwar bei allen vier Ratten-Stämmen.

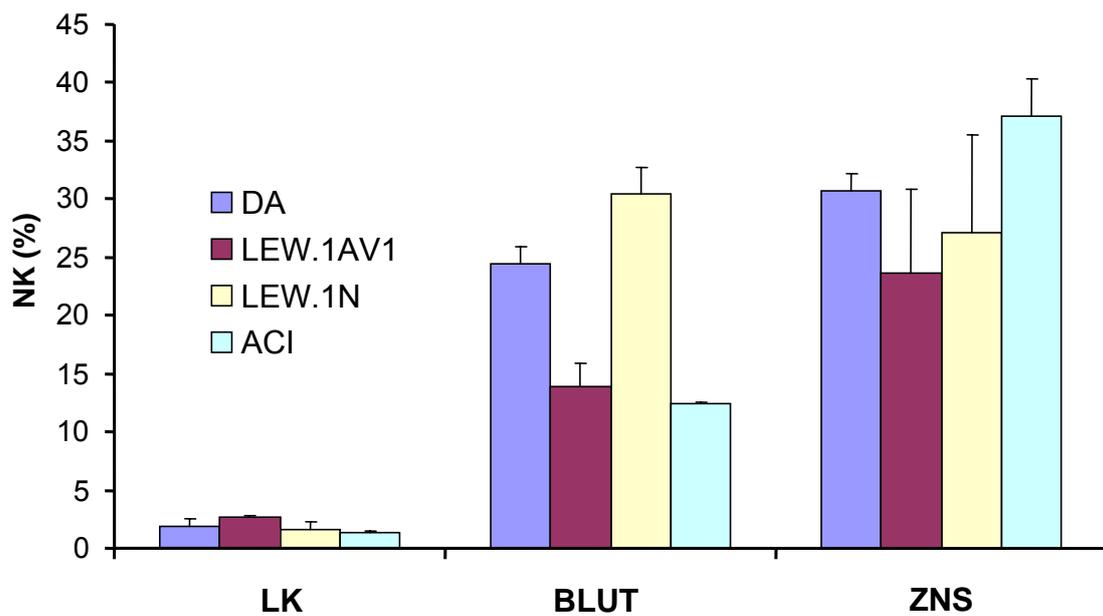


Abb. 29 Anteil NK-Zellen im FACS-Scan

NK-Zellen stellen eine Subpopulation von Lymphozyten dar, die weder der B-Zell- noch der T-Zelllinie zugeordnet wird. Die NK Zellen sind große lymphatische Zellen mit prominenten intrazellulären Granula. Sie machen nur eine sehr kleine Subpopulation der im peripheren Blut vorkommenden Lymphozyten aus. Sie tragen an Ihrer Oberfläche den CD16-Rezeptor, welcher IgGs der Subklassen 1 und 3 erkennt und den zytotoxischen Angriff auf entsprechend opsonierten Zielzellen auslöst (Perish-Novak 2000; Zhang 1997). NK-Zellen sind nach der Immunisierung mit MOG1-125 + CFA in verstärktem Maße im peripheren Blut und im zentralen Nervensystem zu finden.

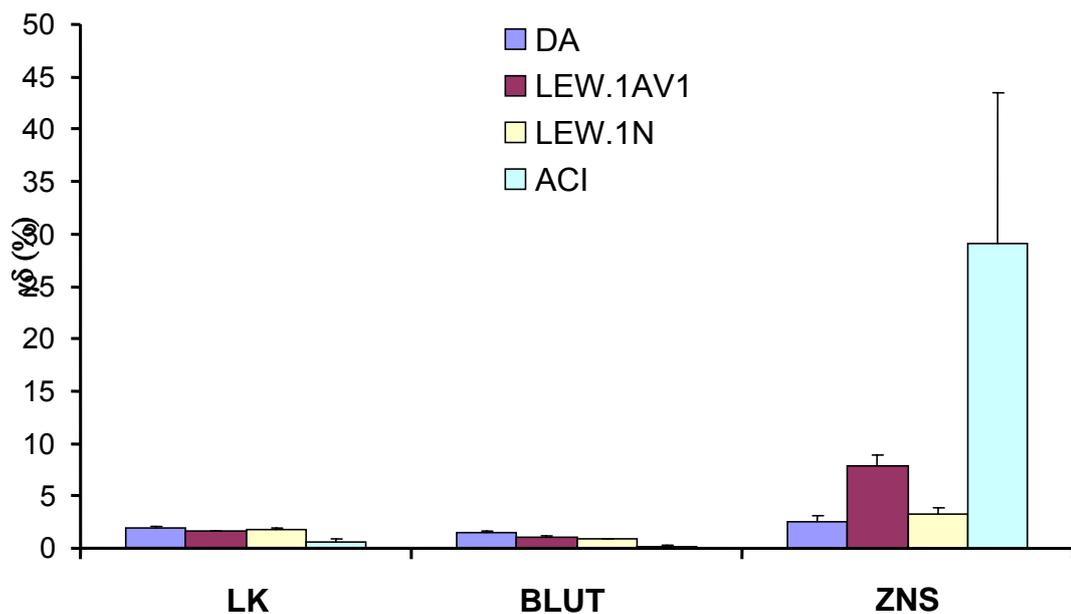


Abb. 30 Anteil $\gamma\delta$ -Zellen im FACS-Scan

$\gamma\delta$ -Zellen stellen eine Subpopulation von T-Zellen dar. Anstelle des auf T-Zellen der adaptiven Abwehr üblichen $\alpha:\beta$ -Rezeptors, exprimieren sie den $\gamma:\delta$ -Rezeptor. Ihre Funktion ist nicht genau bekannt. $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen ihre Liganden im allgemeinen nicht durch MHC-Präsentation sondern direkt und könnten so direkt und schnell auf eine Vielzahl von Molekülen reagieren, die von vielen unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden. Mögliche Liganden sind: Hitze-Schock-Proteine, MHC Klasse IB und außergewöhnliche Nucleotide und Phospholipide (Deng 2004, Aranda 1999, Guy-Grand)

Im Gegensatz zu Peripherie und Lymphknoten werden $\gamma\delta$ -Zellen nach der Immunisierung in deutlich gesteigerter Zahl im zentralen Nervensystem gefunden. Erstaunlicherweise ist die Expression bei den ACI-Ratten, die nicht erkranken, am höchsten.

21.3 Ergebnisse des MACS-Projekts

Mittels der Markierung mit gegen Oberflächenepitope bestimmter Zellpopulationen gerichteter Antikörper konnte der aus den Gewebeproben erhaltene Zellmix nach bestimmten Populationen aufgetrennt werden. An diesen Populationen wurde dann die Expression von CXCR4 und SDF1 mittels mRNA-Bestimmung über die Herstellung von cDNA und PCR genau untersucht.

Es wurden dazu Zellen selektiert, die CD4+ oder CD8+ oder CD45+ sind.

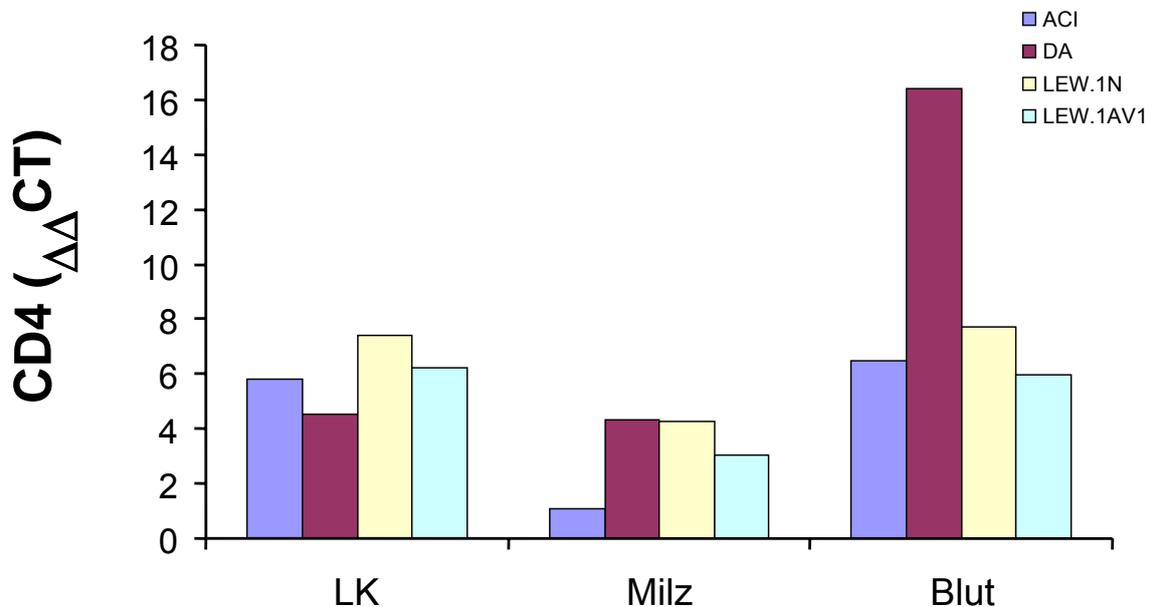


Abb. 31 Anteil CD4+ CXCR4 exprimierende Zellen

Bei den CD4+ Zellen aus dem peripheren Blut, welche vor allem T-Lymphozyten sein dürften, zeigt sich ein sehr hoher mRNA-Bestand für CXCR4 bei den DA-Ratten.

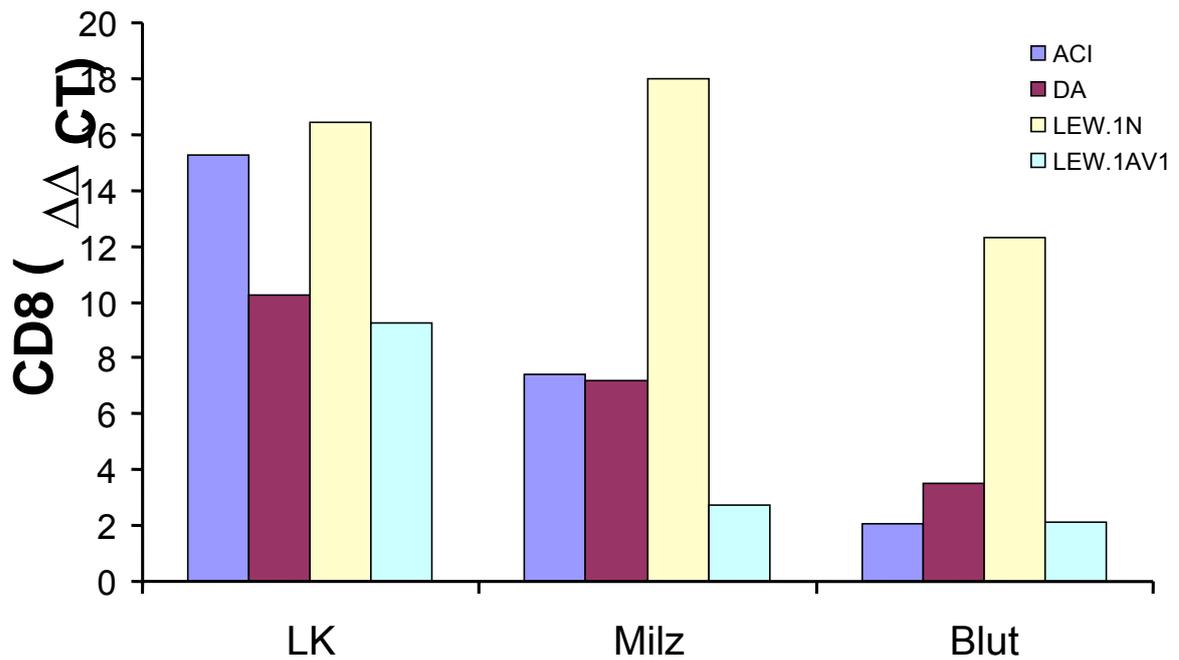


Abb. 32 Anteil CD8+ CXCR4 exprimierende Zellen

In Lymphknoten, der Milz und im peripheren Blut wird CXCR4 relativ stark im Vergleich zu den anderen Stämmen auf CD8+ Zellen von LEW.1N-Tieren exprimiert.

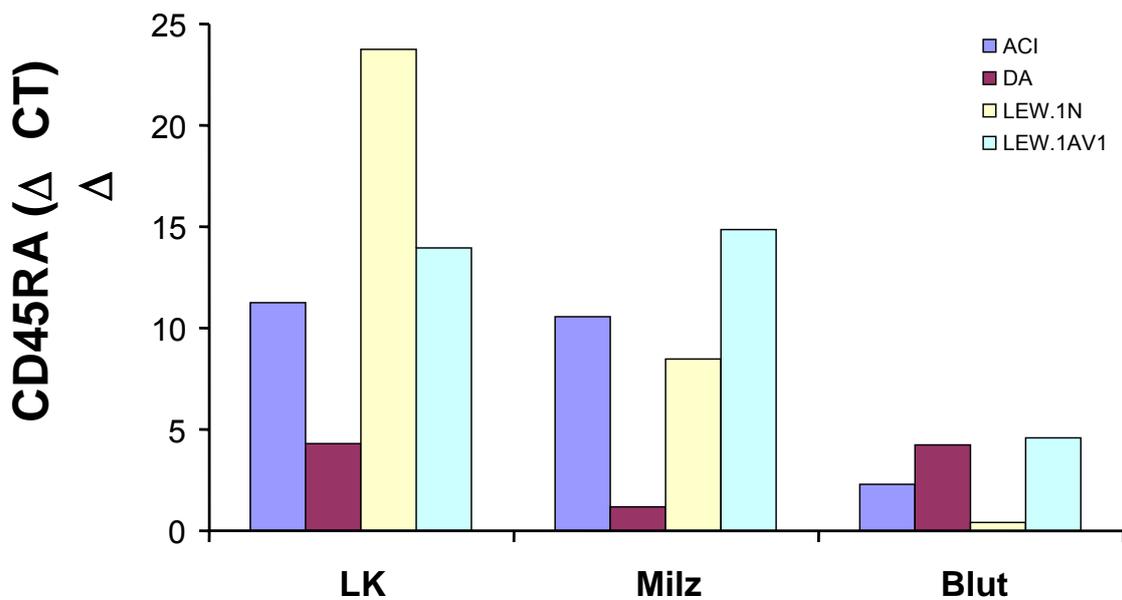


Abb. 33 Expression von CXCR4 auf CD45RA+ Zellen

Bei der Expression von CXCR4 auf CD45RA+ Zellen imponieren ebenfalls die Proben der LEW.1N Tiere, besonders was Lymphknoten und Milz angeht; Im Blut zeigt der LEW.1AV1-Stamm die höchste Expression von CXCR4 auf CD 45RA+-Tieren.

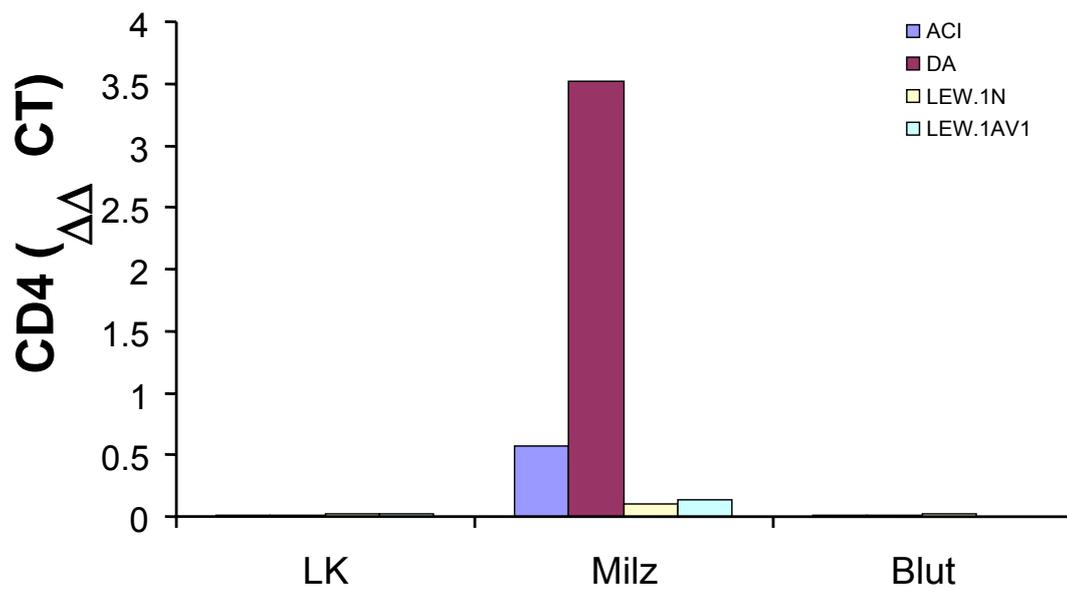


Abb. 34 Expression von SDF1 auf CD 4 positiven Zellen

Bei der Expression von SDF1 auf CD4+ Zellen heben sich die Proben aus der Milz der DA-Ratten hervor.

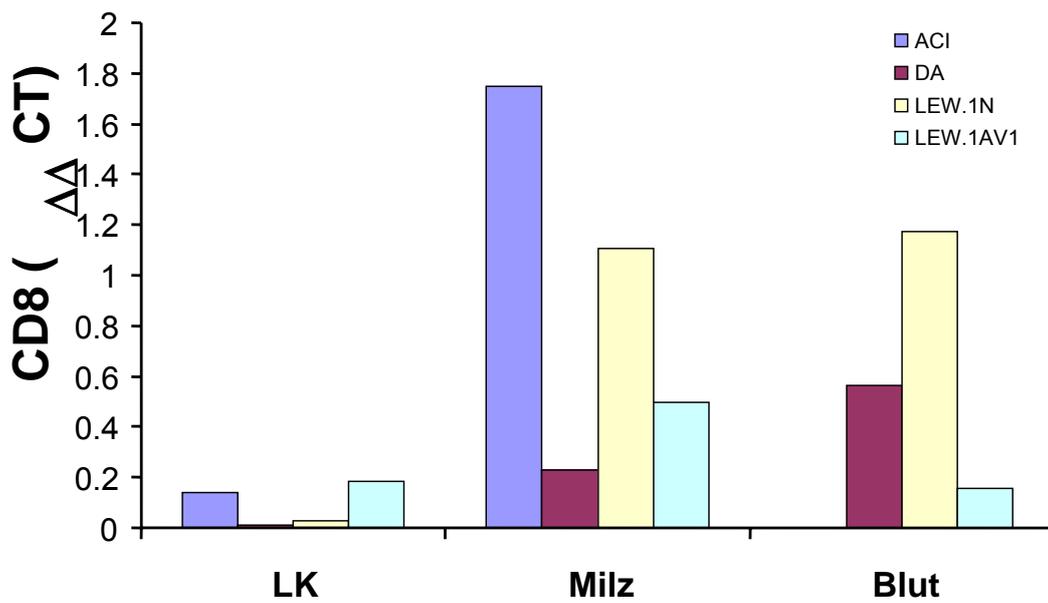


Abb. 35 Expression von SDF1 auf CD8 positiven Zellen

Die Expression von SDF1 auf CD8+ Zellen imponiert besonders bei den Gewebeproben aus Milz und Lymphknoten von ACI-Tieren. Ähnlich stark erhöht ist die SDF1-Expression bei den Proben aus Milz und Blut der LEW.1N-Ratten.

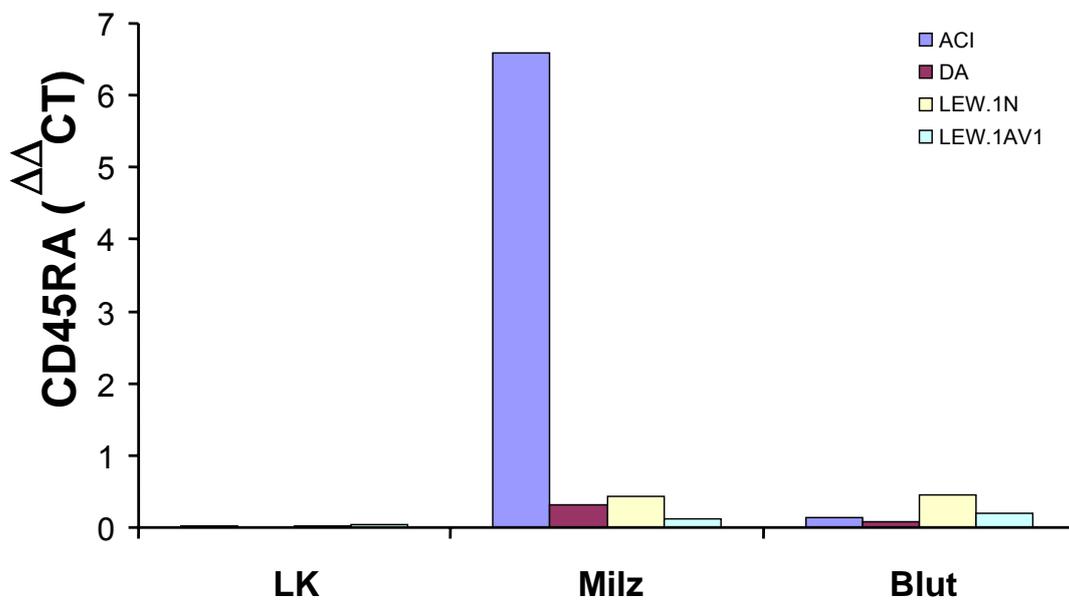


Abb. 36 Expression von SDF1 auf CD45RA+ Zellen

Eine floride Expression von SDF1 auf CD45RA+ Zellen lässt sich bei den Gewebeproben der Milz von ACI-Ratten feststellen.

Die CXCR4-Expression von ZNS-infiltrierenden Zellen stellt sich wie folgt dar:

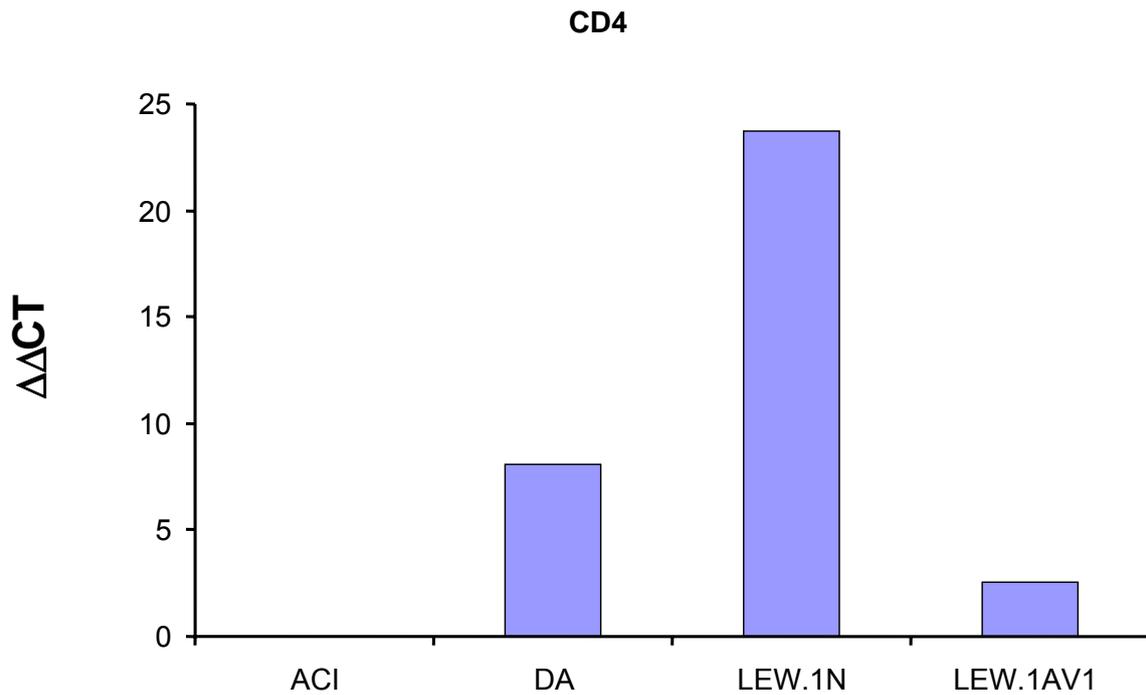


Abb. 37 CXCR4-Expression auf CD4+ ZNS-infiltrierenden Zellen.

Besonders die MACS-aufgereinigten Zellen von DA- und LEW.1N-Tieren zeigen eine hohe Expression von CXCR4.

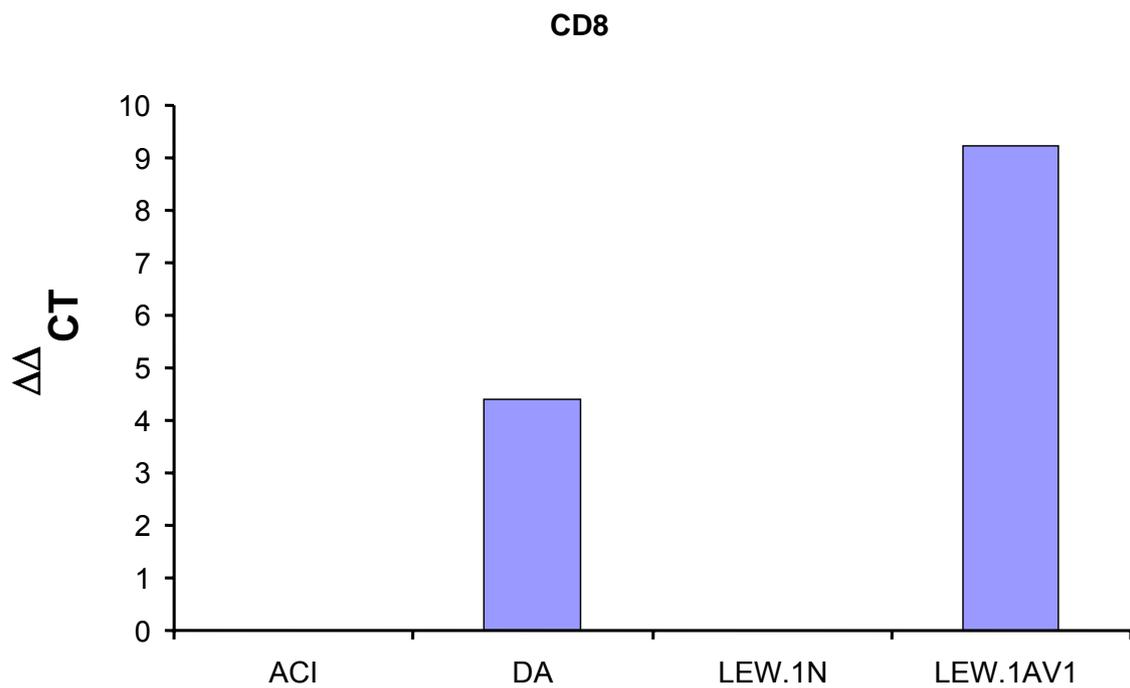


Abb. 38 CXCR4 Expression auf CD8+ ZNS-infiltrierenden Zellen

Die CD8+ ZNS-infiltrierende Zellen von DA- und LEW.1AV1- Tieren weisen eine hohe Dichte von CXCR4 auf ihrer Oberfläche auf.

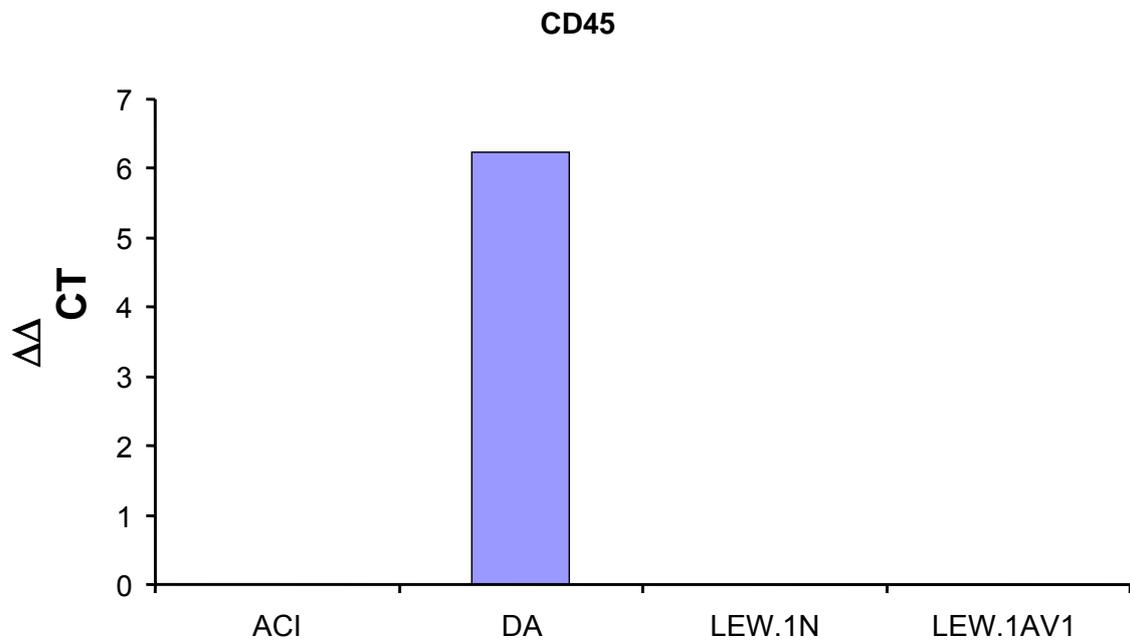


Abb. 39 CXCR4 Expression auf CD45+ ZNS-infiltrierenden Zellen

Die Gewebeprobe von DA-Tieren weisen bei CD45+ MACS-aufgereinigten Zellen eine erhöhte CXCR4-Expression auf.

SDF1:

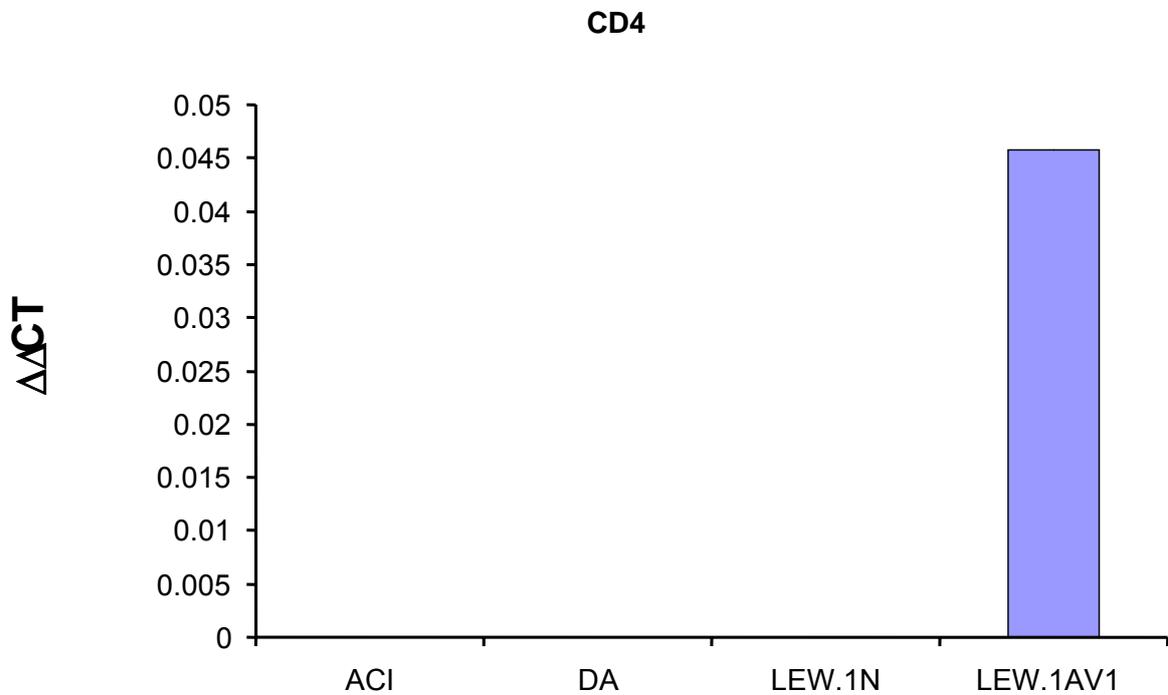


Abb. 40 SDF1 Expression auf CD4+ ZNS-infiltrierenden Zellen.

Die SDF1 Expression auf CD4+ ZNS-infiltrierenden Zellen ist bei LEW.1AV1-Ratten prominent erhöht.

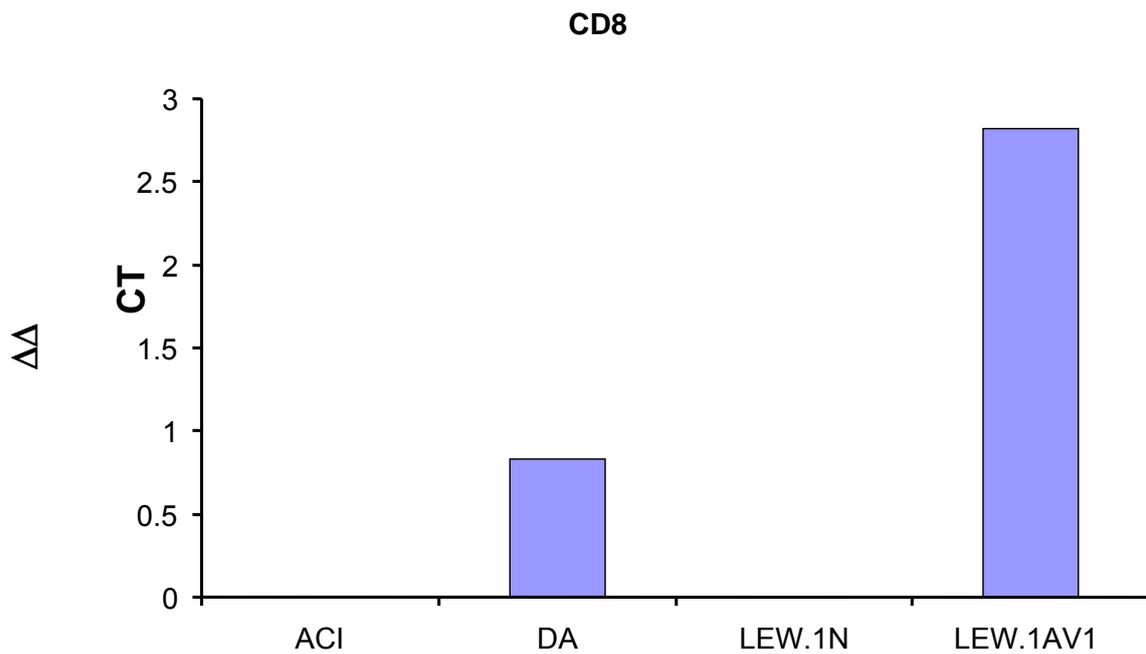


Abb. 41 SDF1 Expression auf CD8+ ZNS-infiltrierenden Zellen

Bei den CD8+ ZNS-infiltrierenden Zellen lassen sich bei den DA- und LEW.1AV1-Tieren eine deutliche Erhöhung der SDF1 Oberflächenexpression nachweisen.

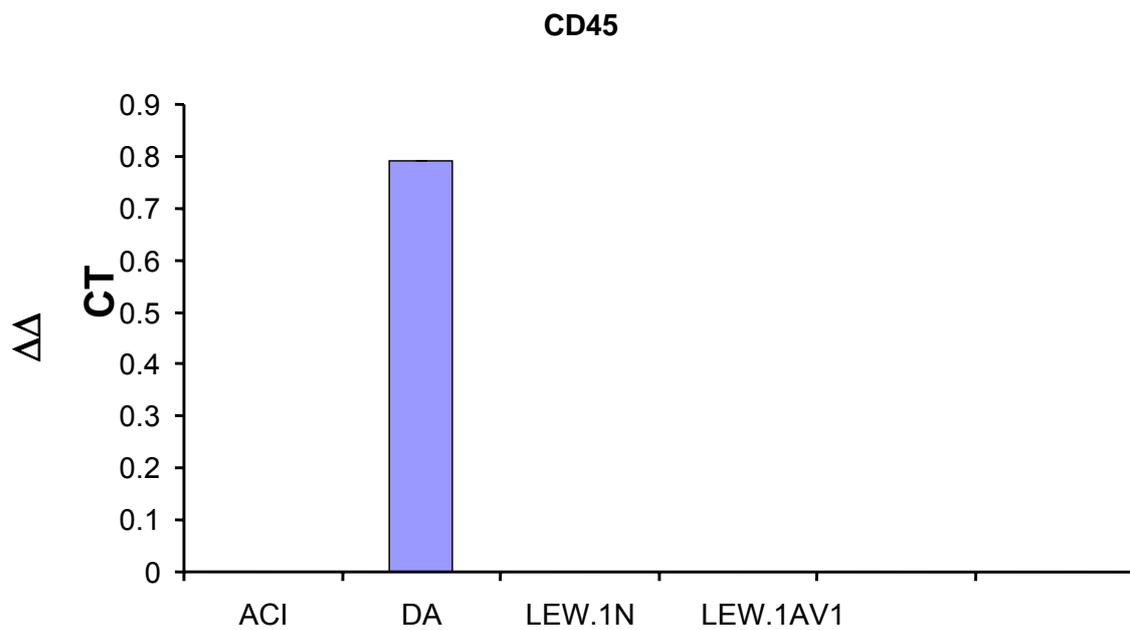


Abb. 42 SDF1 Expression auf CD45RA+ ZNS-infiltrierenden Zellen

Bei den CD45RA+ ZNS-infiltrierenden Zellen dominieren die aus den Gewebeproben der DA-Tieren gewonnenen Zellen.

22 Diskussion

In der Polymerase-Ketten Reaktion Nachweisttechnik konnten eindeutig differentielle Genexpressionsprofile für CXCR4 und SDF1 in unterschiedlichen Organen und Zellpopulationen bei der EAE gefunden werden, die mit der Krankheitsempfänglichkeit korrelieren.

So ist im Gehirn und Rückenmark von DA-Ratten die Expression von CXCR4 bei den Immunisierungen CFA und CFA+MOG bedeutend erhöht. Dazu

korreliert auch die Expression von SDF1 in diesen Geweben. Dies unterstützt die Vorstellung, dass CXCR4 durch SDF1 aktiviert wird (Jo 2000).

Ähnlich verhält es sich auch im Milzgewebe bei DA-Ratten; auch hier ist bei den Immunisierungen CFA und CFA+MOG die CXCR4 Expression prominent erhöht. Wieder entsprechend sichtbar ist die Korrelation mit SDF1, wobei SDF1 in der Milz von DA-Ratten auch bei den nicht immunisierten Ratten erhöht ist. Soweit es sich hier nicht um einen Artefakt handelt, fällt die Erklärung schwer, da singular SDF1 erhöht ist, CXCR4 hingegen nicht. Man sollte hier die multiplen Funktionen von SDF1 in Betracht ziehen (Belmadani 2005, Kang 2005).

In den Lymphknoten ist CXCR4 bei allen Immunisierungen mäßig erhöht. Dies widerspricht nicht den gängigen Vorstellungen der EAE Pathogenese im Zusammenhang mit CXCR4, da CXCR4 nicht nur auf T-Lymphozyten exprimiert wird, sondern auf einer Vielzahl anderer Zellen, darunter immunkompetenten Zellen wie antigenpräsentierenden Zellen, Granulozyten, Makrophagen, und vaskulären Endothelzellen (Jiang 1998).

Die Expression von CXCR4 im peripheren Blut bei DA-Ratten weist eine im Vergleich zu den naiven Tieren eine deutliche Erhöhung der CXCR4 Expression auf; eine Ausnahme stellt hier die IFA+MOG-Immunisierung dar. Dies verdeutlicht nochmals die Wirkung der Immunisierung und deren Zusammenhang mit der Krankheitsentwicklung, was gleichzeitig die Bedeutung des Rezeptors in der Pathogenese der EAE/MS unterstreicht.

Bei den ACI-Tieren sehen die Expressionsmuster für CXCR4 und SDF1 in den Organen Gehirn, Rückenmark und Milz ähnlich aus wie bei den DA-Ratten: Bei den Immunisierungen CFA und CFA+MOG wird CXCR4 und SDF1 sehr stark exprimiert.

In den Gewebeproben von Lymphknoten der ACI-Tiere lässt sich eine generelle Erhöhung der CXCR4-Expression finden. Eine Tendenz zu relativ höheren

Werten bei den immunisierten Tieren im Vergleich scheint als Reaktion auf die Immunisierungen zustande zu kommen.

Insgesamt lassen sich aus den vorliegenden Daten der PCR-Untersuchung differentielle Genexpressionsmuster für CXCR4 und SDF1 in Zusammenhang mit der Immunisierung belegen.

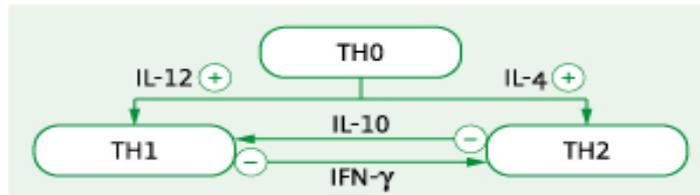
Die Tatsache, dass bei den suszeptiblen DA-Ratten die Gen-Expression ähnlich verläuft wie bei den nicht-suszeptiblen ACI-Tieren, welche keine Klinik entwickeln, lässt den Schluss zu, dass CXCR4 bei der Entwicklung einer EAE von großer Bedeutung ist, dass es aber noch zusätzliche exogene oder endogene Faktoren geben muss, damit die Pathogenese ihren Lauf nehmen kann. Von großem Interesse ist es nun, diese weiteren Faktoren zu identifizieren.

Mithilfe der FACS-Methode lassen sich die einzelnen Zelllinien, von denen vermutet wird, dass sie bei der Pathogenese der EAE eine Rolle spielen, genau bezüglich ihres Vorkommens in den einzelnen Gewebeproben klassifizieren:

Die Ergebnisse des FACS-Projekts zeigen, dass CD4⁺ Zellen in Lymphknoten und Blut in deutlich erhöhter Zahl vorkommen. Im ZNS ist ihre Anzahl am stärksten bei LEW.1N Tieren heraufreguliert. Dies korreliert gut mit der Klinik, da diese Ratten am suszeptibelsten erscheinen (Lobell 2003).

Die hohe Zahl an CD4⁺ T-Zellen steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Pathogenese der EAE bzw. MS. CD4⁺ T-Zellen können in weitere Subpopulationen unterteilt werden, die sich in Funktion und den von ihnen produzierten Zytokinen unterscheiden (Moosmann 1989, Romagnani 1997).

CD4⁺ Th1-Zellen entstehen unter Einwirkung von Interleukin12 (IL-12) aktivierten Makrophagen aus Th0 Zellen; sie führen zur zellvermittelten Immunität, unter anderem produzieren sie Interferon γ und Interleukin2; Interferon γ wiederum hemmt Th2-T-Zellen. Th2-Zellen entstehen auch aus Th0 Zellen, aber unter Einwirkung von Interleukin 4. Im Gegenzug bilden sie Interleukin 10, was wiederum Th1-Zellen hemmt (Matzusaki 2005).



TH2-Zellen sind entscheidend für die humorale Immunität: Sie aktivieren B-Zellen. Die hohe Anzahl an CD4+ Zellen lässt sich gut mit den immunologischen Grundlagen der MS erklären: Die CD4+ Zellen interagieren mit den angebotenen Antigenen, prozessieren diese und stimulieren die entsprechenden Immuneffektorzellen (Xiao 1999). 1996 berichtete Kroemer, dass eine Imbalance zwischen Th1 und Th2 Zellen bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen entscheidend sein kann (Kroemer 1996).

Passend hierzu zeigen sich die Werte von Ox6 markierten Zellen: Ox6 ist ein B-Zellmarker. B-Zellen entwickeln sich in den Lymphknoten, präziser gesagt in den Keimzentren der Lymphfollikel. Hier werden die Zellen, die Antikörper gegen ein entsprechendes Epitop bilden, selektiert. Dies geschieht unter anderem mit Hilfe von T-Lymphozyten. Der hohe Anteil von B-Lymphozyten in den Lymphknoten, dem peripheren Blut und auch ein relativer hoher Anteil der Zellen im ZNS-Gewebe lässt sich dadurch erklären, dass die CD4+ Th2-Zellen ihrer Funktion nachkommen und B-Zellen aktivieren (Skundric 2005). Die immunologische Funktion wird auch in der abgestuften Häufigkeitsverteilung deutlich: In den Lymphknoten, dem Entstehungsort der high affinity B-Lymphozyten zeigt sich die höchste B-Zelldichte, die über den Transportweg zum Effektororgan ZNS hin abnimmt.

CD8+ Zellen stellen eine Subpopulation von Lymphozyten dar, deren CD8-Oberflächenmarker Rezeptor für MHC-Moleküle der Klasse I ist. Ihre Funktion besteht einerseits darin, die Immunantwort anderer T- und B-Lymphozyten zu suprimieren. Dies geschieht entweder durch direkten Zellkontakt oder, nach Stimulation durch ein Antigen, durch Sekretion von Lymphokinen. Die

bekanntesten Vertreter dieser Klasse von Kommunikationsproteinen sind Interleukine und Interferone, wie Interferon β , welches auch erfolgreich in der Therapie der MS eingesetzt wird (Biernacki 2005). Andererseits sind sie vornehmlich als zytotoxische T Zellen (CTL) für zellvermittelte Zytotoxizität durch Induktion von Apoptose in Zielzellen verantwortlich. Nachdem Antigen auf der Zielzelle erkannt wird, schütten die CTL zytotoxische Effektorproteine (Perforin und Granzyme) aus, welche den programmierten Zelltod induzieren. Interessant ist nun die Verteilung von CD8+ T-Zellen: Hier fallen insbesondere die erhöhten Werte bei den ACI-Ratten auf; bedenkt man, dass CD8+ Zellen, die auch Suppressorzellen genannt werden, die Immunantwort anderer T-Lymphozyten (v.a. Helferzellen Th) unterdrücken. ACI-Ratten weisen keine Klinik auf und haben die höchste Zahl von CD8+ T-Lymphozyten im ZNS-Gewebe. Hier spielt möglicherweise die regulatorische Funktion von CD8+ T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle, da bei ACI-Tieren die anderen Effektorzellen des Immunsystems in vergleichbarem Maße in den Gewebeproben enthalten sind (Governman 2005). Eine regulatorische, schützende Funktion von CD8+ wurde bereits 1992 postuliert (Jiang 1992, Koh 1992) und konnte 2004 von Petterson et al. Bestätigt werden (Petterson 2004, Linker 2005).

In floriden Entmarkungsherden ist eine prominente Population von T-Lymphozyten nachweisbar, die sich zu einem großen Teil aus CD8+-Lymphozyten rekrutiert. Dies verleitet zunächst zur Annahme, dass es sich wohl doch um zytotoxische T-Zellen handelt; andererseits kann hier wieder die schützende Funktion von CD8+-Zellen in Betracht gezogen werden: Die Entmarkungsherde der MS und EAE sind meist selbstlimitierend, daher scheint sinnvoll, anzunehmen, dass die sich in den Entmarkungsherden gefundenen CD8 positiven Zellen für diese Limitation verantwortlich zeichnen.

Sehr gut mit dem klinischen Erscheinungsbild deckt sich auch der relative Anteil von Makrophagen in den einzelnen Gewebeproben. Makrophagen werden über verschiedene Interleukine, unter anderem Interferon γ von CD4+ Th1-Zellen

stimuliert. Sie selbst produzieren Monokine. Ihre Aufgabe besteht zum einen in der Phagozytose, zum anderen in der Antigenpräsentation. Die Phagozytose wird erleichtert, wenn die entsprechenden Zielzellen oder Antigene durch Proteine des Komplementsystems opsoniert sind. Die opsonierten zu phagozytierenden Partikel werden von spezifischen Rezeptoren für Komplementproteine und Fc-Region der Antikörper erkannt.

Zum anderen sind Makrophagen auch sekretorisch aktiv: Sie produzieren viele der Komplementproteine selbst. Daneben bilden sie viele parakrine Faktoren, darunter Zytokine. Sie sind somit bei der Vermittlung der Entzündungsreaktion und der späteren Reparatur- bzw. Vernarbungsvorgänge beteiligt (Gordon 1996).

Die Bedeutung von Makrophagen und deren organabhängigen Variante im Gehirn, der Mikroglia, bei Autoimmunprozessen ist beträchtlich: Vermutlich wird die Pathogenese der EAE/MS durch T-Zellen eingeleitet, die tatsächliche Effektorfunktion übernehmen aber andere Zelltypen, unter denen ins ZNS einwandernde Makrophagen und Mikroglia an vorderster Stelle stehen (Sunnemark 2005). Frühere Studien demonstrierten, dass Makrophagen-Depletion mit Silikatstaub das Einsetzen klinischer Erkrankungszeichen bei LEW Ratten mit MOG-induzierter EAE deutlich verzögert (Brosnan 1981) und die Schwere der Erkrankung lindert. In einer weiteren Studie wurden Liposomen, welche Dichlormethylene Diphosphonat (Cl₂MDP) enthielten, eingesetzt, um die Makrophagen aus dem Organismus zu eliminieren; dadurch konnte eine klinische Manifestation der EAE vollständig unterbunden werden (Huitinga 1995).

Für die Detektion der Makrophagen in den einzelnen Gewebeproben wurde Ox42, ein gegen CD11b gerichteter Antikörper, verwendet. CD11b ist ein typisches Epitop auf Makrophagen.

Der prozentuale Anteil an Makrophagen im ZNS bei den Gewebeproben der DA, LEW.1AV1 und LEW.1N ist deutlich erhöht, bei den ACI-Tieren hingegen nicht. Dies wird durch die Annahme der Effektorrolle von Makrophagen bei autoimmunen Prozessen unterstützt.

Die Verteilung von NK-Zellen (Natural-Killer) ähnelt der Verteilung von Makrophagen: Ihr Anteil ist besonders im ZNS und peripheren Blut erhöht. NK-Zellen werden weder der T- noch der B-Zelllinie zugeordnet.

Im Rahmen der Pathogenese der MS erfüllen sie eine der den Makrophagen vergleichbare Funktion: Sie sind am Abbau der Myelinscheiden maßgeblich beteiligt.

$\gamma\delta$ -Zellen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von übrigen T-Lymphozyten, die mit dem T- α,β -Zellrezeptor ausgestattet sind. Eine Gemeinsamkeit besteht allerdings darin, dass beide Zelltypen ihre Rezeptorvielfalt durch somatische Rekombination erreichen (Hayday 2000). Die Funktion von diesen Zellen ist aber längst nicht so gut bekannt wie die der $\alpha\beta$ -T- und B-Zellen. Erst in letzter Zeit hat sich herausgestellt, dass diese Zellen wohl doch größere Bedeutung in der Steuerung und Regulation von Immunprozessen haben: So hat sich beispielsweise gezeigt, dass $\gamma\delta$ -Zell-defiziente Mäuse einen derartigen Immundefekt vorweisen, dass ihr Immunsystem nicht gegen *Nordicaspezies*, einer gram-positiven Bakteriengattung, die als Aerosol in die Lunge gelangt, vorgehen kann; der Defekt liegt scheinbar in der Mobilisierung von Neutrophilen (King 1999).

Es gibt starke Hinweise, dass $\gamma\delta$ -Zellen nicht an die Anwesenheit von MHC-Molekülen zur Antigenerkennung gebunden sind bzw. über MHC angebotene Antigene überhaupt nicht erkennen können (Schild 1994, Tanaka 1995). Diese Annahme wird auch von der Tatsache unterstützt, dass $\gamma\delta$ -Zellen in der Regel CD4- und CD8- sind.

Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass $\gamma\delta$ -Zellen eine Effektorrolle im Immunsystem einnehmen, wenn es um die Bekämpfung von Infektionen geht. Unklar ist jedoch immer noch, ob dies durch direkte Regulation der Aktivität von $\alpha\beta$ -Zellen geschieht oder über eine IL-10-Produktion vermittelt wird (Hayday 2000, Roberts 1996). Zum anderen konnte auch gezeigt werden, dass Versuchstiere ohne $\gamma\delta$ -Zellen immunopathologische Dysregulationen aufweisen

(Hayday 2000). Interessanterweise können $\gamma\delta$ -Zellen auch auf die Entzündungsreaktion reagieren und diese limitieren (Peng 1996). Es konnte unstrittig nachgewiesen werden, dass die spontane, autoreaktive Hyperreagibilität von T-Zellen, welche zu lupoiden und autoimmunephritischen Erscheinungen führt, bei Mäusen ohne $\gamma\delta$ -Zellen um einiges stärker ausgeprägt ist als bei Kontrolltieren, die über die $\gamma\delta$ -Zellen verfügen (Hayday 2000).

Für diese regulatorische Funktion würde die Verteilung von $\gamma\delta$ -Zellen in den Gewebeproben der verwendeten Versuchstiere sprechen: Bei ACI-Tieren ist der Anteil an $\gamma\delta$ -Zellen im ZNS im Vergleich zu den anderen Stämmen sehr eindrücklich erhöht. Man könnte auf eine schützende Funktion der $\gamma\delta$ -Zellen schließen, da ACI-Tiere bekanntermaßen keine Klinik entwickeln.

22.1 MACS

22.1.1 CD4 CXCR4

Bei CD4+ ZNS-infiltrierenden Zellen ist die CXCR4-Expression quasi analog zum klinischen Verlauf der EAE. Bezüglich der Klinik erreichen LEW.1N Tiere die höchsten Scores. Gleichzeitig weisen CD4+ Zellen bei LEW.1N Tieren die höchste CXCR4-Dichte auf ihrer Oberfläche auf. Entsprechend nimmt die Oberflächenexpression von CXCR4 über die LEW-Ratten zu den DA-Ratten hin ab. CD4+ ZNS-infiltrierenden Zellen von ACI-Ratten exprimieren kein CXCR4 auf ihrer Oberfläche.

CXCR4 ist vor allem in der HIV-Forschung bekannt, da ihm eine wichtige Rolle als Korezeptor für X4-HIV-Stämme nachgewiesen werden konnte (Levy 1993). Es wird sowohl auf naiven als auch auf T-Gedächtniszellen exprimiert (Eckstein 2001), wobei aber naive CD4+ T-Zellen eine deutliche höhere CXCR4-Dichte aufweisen (Rabin 1999, Bleul 1997)

Die Funktionen von CXCR4 auf CD4+ Zellen gehen aber weit über die eines Korezeptors für HIV hinaus: CXCR4 spielt im Zusammenhang mit seinem

einzigsten bekannten Liganden SDF1 (Aiuti 1996, Shirozu 1995) eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und der Reaktion auf chemotaktische Reize.

So ist das Verteilungsmuster der CXCR4-Expression bei den CD4-positiven Zellen nicht verwunderlich. CD4+ Zellen vermitteln als Th1 Subtyp die zelluläre Immunität, als Th2 Subtyp die humorale Immunität (Romagni 1996). In dieser Funktion als Effektorzellen des Immunsystems sind sie entscheidend an der Pathogenese der EAE/MS beteiligt, da sie zum einen weitere Effektorzellen durch Chemotaxis anziehen und zum anderen direkt mit den für die EAE/MS spezifischen Antigenen interagieren (Sospedra 2005).

Der Expressionsverteilung nach zu urteilen, sind besonders viele CXCR4+ CD4+, vermutlich auf chemotaktische Reize hin, wahrscheinlich von SDF1, ins Zielgewebe ZNS migriert und waren dort bei der Entstehung der EAE/MS mitbeteiligt. Dies deckt sich gut mit der Tatsache, dass bei ACI-Tieren keine CXCR4+CD4+ im ZNS nachgewiesen werden konnten.

22.1.2 CD8 CXCR4

Es ist schon lange bekannt, dass CXCR4 ein Korezeptor für das Eindringen von T-zelltropen HIV-Viren in die Zielzellen ist. Daher wurde die CXCR4-Produktion zumeist auf CD4+ T-Zellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass CXCR4 vor allem auf naiven CD4+-Zellen exprimiert wird (Rabin 1999, Bleul 1997).

CXCR4 kommt aber auch sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten CD8+ T-Zellen vor, wobei es hauptsächlich auf naiven CD8+ T-Zellen exprimiert wird (Kobayashi 2004). Um CD8+ T-Lymphozyten weiter zu differenzieren, eignet sich die Analyse folgender Oberflächenmarker: CD27, CD28 und CD45RA. Je nach Muster lassen sich die CD8+ T-Zellen dann einteilen, und zwar in naive Zellen (CD27+CD28+CD45RA+), Gedächtniszellen (CD27+CD28+CD45RA-), Gedächtnis/Effektorzellen (CD27^{low}CD28-CD45RA+/-) und reine Effektorzellen (CD27+CD28+CD45RA+/-) (Tomiyama 2002).

Kobayashi konnte 2004 zeigen, dass CXCR4 auf CD8+ T-Zellen vor allem auf naiven und Gedächtniszellen (eingeteilt anhand des CD27CD28CD45RA-Expressionsmusters, s.o.) vorkommt, während die Expression von CXCR4 während der Entwicklung vom Gedächtniszelltyp zum Effektorzelltyp herab reguliert wird. Darüber hinaus war die CXCR4-Expression negativ mit der Perforin-Expression korreliert, was darauf hindeutet, dass die CXCR4-Expression mit der Differenzierung zu Effektorzellen eingestellt wird (Kobayashi 2004). Neuere Studien konnten nachweisen, dass CXCR4 eventuell eine Rolle beim Rolling und Sticking von CD8+T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen mit High Endothelial Venules (HEV) spielt (Scimone 2004).

Betrachtet man nun die Verteilung von CD8+ CXCR4 exprimierenden Zellen, so fällt die gesteigerte Anzahl in Lymphknoten und Milz auf, während die Zahl im Blut gemäßigt ist. Anhand der oben erwähnten Theorien kann man dies nun so verstehen, dass in den beiden lymphatischen Organen vermehrt naive CD8+ Zellen vorkommen, die zum Beispiel weiter geprägt werden. Die diffuse und bei allen Stämmen ähnliche Verteilung könnte darauf schließen lassen, dass die Supressorfunktion von CD8+ Zellen hier erst geprägt werden muss und man dann erst im weiteren Verlauf der Erkrankung das CD8-Verteilungsmuster findet wie in der PCR. ES kann sich aber auch um ein leicht erhöhtes „Grundrauschen“ handeln, eben der Basisbestand von naiven CD8+-T-Zellen. Zu bedenken ist aber auch, dass die Wahrscheinlichkeit, CD8+ Zellen in den lymphatischen Organen Milz und Lymphknoten anzutreffen, relativ höher ist als beispielsweise im Blut.

22.1.3 CD45RA CXCR4

CD45RA+ CD4+ ZNS-infiltrierende Zellen finden sich nur bei DA-Tieren. CD45 wird auf Zellen haematopoetischen Ursprungs mit Ausnahme der Erythrozyten exprimiert. CD45 ist ein Transmembranrezeptor vom Tyrosinphosphatasetyp; Es gibt mindestens neun Isoformen dieses Rezeptors. Diese Vielfalt ist auf

Gewebsspezifisches RNA-Splicing der Exons 4-7 eines einzigen Genes, das für verschiedene N-terminale Peptidsegmente codiert, zurückzuführen. Die CD45RA-Isoform kommt vor allem auf naiven und ruhenden T-Zellen und T-Zellen aus den medullären Anteilen des Thymus vor (McMichael 1987, Gaya 1990, Trowbridge 1994, Matsushima 2001).

Geht man auch hier davon aus, dass CXCR4 für das Migrationsverhalten der markierten Zellen eine Rolle spielt (Shirozu 1995), stellt sich die Frage nach der Funktion von CD45RA⁺ T-Zellen. Es handelt sich vor allem um Gedächtniszellen und naive Zellen. Dies konnte in Versuchen mit Knochenmarkstransplantationspatienten 1999 von Arlettaz nachgewiesen werden (Arlettaz 1999).

Anhand der hier angewandten Nachweismethode lässt sich nicht eindeutig bestimmen, ob es sich um naive T-Zellen oder Gedächtniszellen im ZNS von den DA-Tieren handelt. Aufgrund der deutlich erniedrigten Thymusfunktion bei erwachsenen Tieren liegt die Vermutung nahe, dass es sich um Gedächtniszellen handelt.

Allerdings lässt sich ihnen anhand des Verteilungsmusters keine genaue Funktion bei der EAE-Pathogenese zuweisen.

22.1.4 CD4 SDF1

Die SDF1 Expression auf CD4⁺ ZNS-infiltrierenden Zellen ist bei LEW.1AV1-Ratten prominent erhöht, bei den anderen Stämmen lässt sich keine SDF1 Expression nachweisen. SDF1 ist ein hochpotentes Lymphozyten anziehendes Chemokin (Bleul 1996). Es nimmt auch bei der Myelo- und Lymphopoese eine wichtige Position ein (Nagasawa 1996). Die *in vitro* offensichtlichen Effekte von SDF1 auf junge und naive Zellen lassen vermuten, dass SDF1 wichtige Funktionen bei der Migration und dem homing von Lymphozyten und haematopoetischen Zellen hat (Aiuti 1996). Aus der Verteilung könnte man schließen, dass es bei den LEW.1AV1-Tieren CD4⁺ Zellen autokrin wirkt: Bei diesen Tieren konnten sowohl eine hohe Zahl von CXCR4⁺CD4⁺ als auch

SDF1-produzierenden CD4+ Zellen nachgewiesen werden. Eventuell locken die bereits ins ZNS migrierten Zellen weitere Zellen zur Unterstützung an.

22.1.5 CD8 SDF1

Bei den CD8+ ZNS-infiltrierenden Zellen lassen sich bei DA- und LEW.1AV1-Tieren eine deutliche Erhöhung der SDF1 Expression nachweisen. Wie bereits oben erwähnt, kann es sich bei CD8+-Zellen sowohl um Supressorzellen als auch um zytotoxische Zellen handeln (Mason 1992). Das Expressionsmuster von SDF1 bei ZNS-infiltrierenden CD8+ -Zellen könnte einen Hinweis darauf geben, dass es sich, im Gegensatz zu den beim PCR- und FACS-Analyse erhobenen Daten, um zytotoxische CD8+-Zellen handelt. Dass diese Zellen gleichzeitig SDF1 exprimieren, könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch sie weitere Zellen nicht nur der gleichen Gattung anlocken wollen.

22.1.6 CD45RA SDF1

Bei den CD45RA+ ZNS-infiltrierenden Zellen dominieren die aus den Gewebeproben der DA-Tieren gewonnenen Zellen. Mit gegen CD45RA gerichteten Antikörpern werden naive und Gedächtnis T-Zellen selektiert (Arlettaz 1999).

Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass es sich wohl eher um Gedächtnis-T-Zellen handelt. Bei Ihnen könnte man im Rahmen ihrer regulatorischen Funktion (Matsushima 2001) vermuten, dass sie zu einem früheren Zeitpunkt bereits durch Antigenkontakt insbesondere mit den bei der MOG-Immunisierung verwendeten Antigenen, geprägt wurden und jetzt mit Hilfe von SDF1, welches nachgewiesenermaßen ein sehr potenter chemotaktischer Faktor ist (Arlettaz 1999), im klinischen Stadium der EAE/MS Immuneffektorzellen anlocken.

Unklar bleibt allerdings, weshalb nur bei DA-Tieren die CD45RA+ Zellen auch SDF1 exprimieren.

22.2 Aussichten

Eine weitere Charakterisierung der molekularen Pathogenese der EAE bzw. MS besonders im Hinblick auf CXCR4 und den noch nicht bekannten Cofaktoren, wird die Einblicke in die Pathogenese und deren Verständnis vertiefen, so dass man, wenn die Mechanismen vollständig aufgeklärt sind, daran denken kann, aktiv einzugreifen: Vorstellbar wäre zum Beispiel eine Blockade von Rezeptoren wie CXCR4 mit monoklonalen Antikörpern was eine Unterbindung einer Progression oder gar einer klinischen Manifestation bewirken könnte.

23 Schlussfolgerungen

Als Ergebnis konnten differentielle Genexpressionsprofile für CXCR4 und CXCL12 in unterschiedlichen Organen und Zellpopulationen bei der EAE gefunden werden, die mit der Krankheitsempfänglichkeit übereinstimmen.

Es besteht eine Korrelation zwischen Immunisierung mit CFA und CFA+MOG und der Genexpression. Zu beachten ist jedoch die vermehrte Genexpression von CXCR4 und SDF1 auch bei naiven Tieren. Hier stellt sich die Frage, welche Rolle CXCR4 und SDF1 bei der Krankheitsentwicklung spielen. Eine reine Erhöhung der Expression als solche scheint zumindest unter bestimmten Voraussetzungen nicht krankheitsauslösend zu sein.

Die entscheidende und alleinige Schlüsselrolle für die Entwicklung der EAE konnte CXCR4 mit Hilfe der Gen-Arrays also nicht sicher nachgewiesen werden. Zum einen zeigen die enorm erhöhten Werte für CXCR4 und SDF1 im peripheren Blut bei naiven Kontrolltieren, dass eine reine Erhöhung der Expression der beiden Moleküle nicht ausreicht, um eine EAE auszulösen. Zudem können auch bei klinisch gesunden Primaten potentiell enzephalitogene, gegen Bestandteile der Myelinscheiden gerichtete T-Zellen gefunden werden (Meinl 1997).

Dennoch lässt sich sagen, dass die EAE-Erkrankung in der Regel mit einer erhöhten CXCR4- und SDF1 Expression in den Schlüsselgeweben ZNS und lymphatische Organe einhergeht. Die gleichzeitige Erhöhung der Expression dieser beiden Faktoren auch beim nicht-suszeptiblen Stamm ACI zeigt jedoch, dass es weitere Faktoren für die Krankheitsentstehung geben muss, die unabhängig von CXCR4 und SDF1 für die Entstehung der EAE bzw. Multiplen Sklerose verantwortlich sind.

Betrachtet man die Pathogenese der Krankheit, so ist diese Annahme nahe liegend, da es sich dabei nicht um einen eindimensionalen Prozess handelt, angefangen von der Proliferation der Immunzellen, der Schrankenstörung der Bluthirnschranke, über die Migration der immunkompetenten Zellen ins ZNS bis hin zur Entmarkung durch die entzündliche Reaktion. An der molekularen Vermittlung der Pathogenese sind mehrere Mechanismen beteiligt (Imitola 2005, Stanislaus 2005). Dennoch sollte man den Blick weiterhin auf CXCR4 und seine Liganden richten, da sie, was sich besonders im PCR-Projekt herauskristallisiert hat, mittelbar mit der Entstehung der EAE im Zusammenhang stehen.

Diese Ergebnisse bilden einen weiteren Hinweis darauf, welche Faktoren bei der MS von entscheidender Bedeutung sein könnten und eröffnen möglicherweise Angriffspunkte für neuartige therapeutische Interventionen.

24 Zusammenfassung

Die Entstehung der Läsionen im zentralen Nervensystem (ZNS) bei der Multiplen Sklerose (MS) ist trotz intensiver Untersuchungen immer noch unvollständig verstanden. Die MS ist eine Autoimmunerkrankung, bei der autoreaktive T-Zellen, die gegen Myelinbestandteile des ZNS gerichtet sind, einen Entzündungsprozess induzieren, der zu einer sekundären Makrophagen-Rekrutierung mit daraus folgender Myelindestruktion führt.

In Expressionsanalysen mit Affymetrix® Genarrays im Tiermodell der Multiplen Sklerose, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), fand sich eine deutliche Heraufregulation des Chemokinrezeptors CXCR4 im Lymphknoten und im ZNS bei Ratten. Im Promotionsprojekt wurde die Expression und Bedeutung von CXCR4 und dessen Liganden CXCL12 (SDF1) genauer untersucht.

Mittels drei technologischer Ansätze, der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), der Durchflusszytometrie und der magnetischen Zellseparation, wurde bei der EAE und Kontrollen untersucht, welche Zellen die entsprechenden Rezeptoren und Liganden exprimieren und wie die Expression beeinflusst werden kann. Untersucht wurde, inwiefern die unterschiedliche Suszeptibilität in Rattenstämmen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund mit der Expression von CXCR4 und seinem Liganden SDF1 korreliert. Im Besonderen wurde die Expression von CXCR4 und CXCL12 in verschiedenen Organsystemen (Lymphknoten, ZNS, Milz, Blut, Knochenmark, Rückenmark) untersucht.

Nicht nur der Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsgrad und der Stammzugehörigkeit der verwendeten Ratten wurde dargelegt, sondern auch die Auswirkung der verschiedenen Immunisierungen auf die Erkrankung in den einzelnen Stämmen.

Als Ergebnis konnten differentielle Genexpressionsprofile für CXCR4 und CXCL12 in unterschiedlichen Organen und Zellpopulationen bei der EAE gefunden werden, die mit der Krankheitsempfänglichkeit eindrücklich korrelieren. Hieraus wird deutlich, dass CXCR4 und CXCL12 eine bedeutende Rolle in der Krankheitsentstehung der Multiplen Sklerose einnehmen und als eventuell entscheidende Faktoren neue Ansätze für Therapiemöglichkeiten der Multiplen Sklerose darstellen.

25 **Anhang für Schaubilder:** Anzahl der Tiere, die je Probe untersucht wurden

Abb. 7	Untersuchte Tierart:	DA-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Gehirn			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	4

Abb. 8	Untersuchte Tierart:	DA-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	RM			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	4

Abb. 9	Untersuchte Tierart:	DA-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Gehirn			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	4

Abb. 10	Untersuchte Tierart:	DA-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	RM			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	4

Abb. 11	Untersuchte Tierart:	DA-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Milz			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	4

Abb. 12	Untersuchte Tierart:	DA-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	LK			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	2			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	4

Abb. 13	Untersuchte Tierart:	DA-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Milz			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	4

Abb. 14	Untersuchte Tierart:	DA-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Blut			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	4

Abb. 15	Untersuchte Tierart:	DA-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Blut			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	4

Abb. 16	Untersuchte Tierart:	ACI-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Gehirn			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	8

Abb. 17	Untersuchte Tierart:	ACI-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	RM			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	8

Abb. 18	Untersuchte Tierart:	ACI-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Blut			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	8

Abb. 19	Untersuchte Tierart:	ACI-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Blut			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	8

Abb. 20	Untersuchte Tierart:	ACI-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	LK			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	8

Abb. 21	Untersuchte Tierart:	ACI-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Gehirn			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	8

Abb. 22	Untersuchte Tierart:	ACI-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	RM			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	8

Abb. 23	Untersuchte Tierart:	ACI-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Blut			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	8

Abb. 24	Untersuchte Rattenart:	ACI	DA
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	4	3

Abb. 25	Untersuchte Tierart:	ACI-Ratten			
	Untersuchtes Organ:	Blut			
	Anzahl nichtimmunisierter Tiere:	3			
	Immunisierte Tiere bezüglich	IFA	CFA	IFA+MOG	CFA+MOG
	Anzahl der immunisierten Tiere:	4	4	4	8

Abb. 25 bis Abb. 30 Anzahl untersuchter Ratten bezüglich des untersuchten Organs

Rattenart:		DA	LEW. 1AV1	LEW. 1N	ACI
Untersuchtes Organ:	LK	6	6	6	6
	Blut	6	6	6	6
	ZNS	6	6	6	6

Abb. 31 bis Abb. 36 Anzahl untersuchter Ratten bezüglich des untersuchten Organs

Rattenart:		ACI	DA	LEW. 1N	LEW. 1AV1
Untersuchtes Organ:	LK	6	6	5	5
	Milz	6	6	5	5
	Blut	6	6	5	5

Abb. 37 bis Abb. 42 Anzahl untersuchter Ratten bezüglich des untersuchten Organs

Rattenart:		ACI	DA	LEW. 1N	LEW. 1AV1
Untersuchtes Organ:	ZNS	6	6	5	5

26 Literaturverzeichnis

Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul C., Springer, T., Gutierrez-Ramos, J.C. (1996). The chemokine SDF1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* 185,111-120.

Aranda, R., Sydora, B., Kronenberg, M., Ogra, P., Mestecky, J., Lamm, M., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J. (1999). Intraepithelial lymphocytes: function. *Mucosal Immunology* 429.

Arlettaz, L., Barbey, C., Dumont-Girard, F., Helg, C., Chapuis, B., Roux, E., Roosnek E. (1999). CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4(+)CD45RA(-)RO(+) memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO. *Eur J Immunol.* 12, 3987-94.

Avasarala, J.R., Konduru S.S. (2005). Recombinant Erythropoietin Down-Regulates IL-6 and CXCR4 Genes in TNF-alpha-Treated Primary Cultures of Human Microvascular Endothelial Cells: Implications for Multiple Sclerosis.*J. Mol. Neurosci.* 25, 183-90.

Benveniste, E. (1977). Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med.* 75, 165–73.

Biernacki, K., Antel, J., Blain, M., Narayanan, S., Arnold, D., Prat, A. (2005). Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 62, 563-8.

Belmadani, A., Tran, P., Ren, D., Assimacopoulos, S., Grove, E., Miller, R. (2005). The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors. *J Neurosci.* 25, 3995-4003

Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A., Mackay, C. R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 1925–30.

Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R., Casasnovas, J., Aiuti, A., Springer, T. A. (1996). A Highly Efficacious Lymphocyte Chemoattractant, Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF1). *J Exp Med.* 3, 1101.

Brosnan, C., Bornstein, M., Bloom, B., (1981). The effects of macrophage depletion on the clinical and pathologic expression of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 126, 614–20.

Brück, W., Porada, P., Pose, r S., Rieckmann, P., Hanefeld, F., Kretzschmar, H.,A., Lassmann, H. (1995). Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Exp Neurol* 131, 221-8.

Carroll, M.C., Prodeus, A.P. (1998). Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 10, 36-40.

Crump, M., Gong, J.-H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.-L., Baggiolini, M., Syskes, B., Clark-Lewis, I. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.*, 16, 6996–7007

Deng, M., Liu, J., Pelak, C., Lancto, C., Abrahamsen, M. (2005) Regulation of apoptotic pathways in bovine γ/δ T cells. *J Vetimm.* 11, 11

Dy, J., Rafii S., Hamada T., Moore, M. (2000). Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1. *J Clin Invest.* 05,101-11.

Eckstein, D. A., Penn, M. L., Korin, Y. D., Scripture-Adams, D. D., Zack, J. A., Kreisberg, J. F., Roederer, M., Sherman, M. P., Chin, P. S., Goldsmith, M. A. (2001). HIV-1 actively replicates in naive CD4(+) T cells residing within human lymphoid tissues. *Immunity* 15, 671-82.

Enders, M. J., Clapham, P. R., Marsh, M., Ahuja, M., Turner, J. D., McKnight, A., Thomas, J. F., Stoebenauhaggarty, B., Choe, S., Vance, P. J., Wells, T. N. C., Power, C. A., Sutterwala, S. S., Doms, R. W., Landau, N. R., and Hoxie, J. A. (1996). CD4-Independent Infection by HIV-2 Is Mediated by Fusin/CXCR4. *Cell* 87, 745–756

Federspiel, B., Melhado, I.G., Duncan, A.M.V., Delaney, A., Schappert, K., Clark-Lewis, I., Jirik, F.R. (1993). Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics*, 16, 707–12.

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872–877

Ford M.L., Evavold B.D. (2004). Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8(+) T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 35, 76-85.

Gaya, A. Et al, (1990). *Intl Immunol* 2 :685-689.

Gordon, S., (1995). The macrophage. *Bioessays* 17, 977–86.

Goverman, J., Perchellet, A., Huseby, E. (2005). The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models. *Allergy.* 4, 239-45.

Goverman, J., Perchellet, A., Huseby, E. (2005). The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 4, 239-45

Gupta, S.K., Pillarisetti, K. (1999). Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant. *J Immunol.* 163, 2368-2372.

Guy-Grand, D., Vassalli, P. (2002). Gut intraepithelial lymphocyte development. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 255.

Hayday, A. (2000). $\gamma\delta$ -cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 975-1026

Hayday, A., Roberts, S., Ramsburg, E. (2000). $\gamma\delta$ -Cells and the Regulation of Mucosal Immune Responses. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 161-63.

Hein, T., Hopfenmüller, W. (2000). Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany. *Nervenarzt* 71, 288-94

Huitinga, I., van Rooijen, N., de Groot, C., Uitdehaag, B., Dijkstra, C. (1990). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med.* 172, 1025–33.

Imitola, J., Chitnis, T., Khoury, S. (2005). Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther.* 106, 163-77.

Jagodic, M., Becanovic, K., Sheng, J.R., Wu, X., Backdahl, L., Lorentzen, J.C., Wallstrom, E., Olsson, T. (2004). An advanced intercross line resolves Eae18 into two narrow quantitative trait loci syntenic to multiple sclerosis candidate loci. *J Immunol.* 173, 1366-73.

Jagodic, M., Becanovic, K., Sheng, J.R., Wu, X., Bäckdahl, L., Lorentzen, J.C., Wallström, E. And Olsson, T. (2004). An Advanced Intercross Line Resolves Eae18 into Two Narrow Quantitative Trait Loci Syntenic to Multiple Sclerosis Candidate Loci. *J Immunol.* 173, 1366-73.

Jiang, Y., Salafranca, M., Adhikari, S., Xia, Y., Feng, L., Sonntag, M., deFiebre, C., Pennell, N., Streit, W., Harrison, J. (1998). Chemokine receptor expression in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 86, 1-12.

Jiang, H., Zhang, S. I., Pernis, B. (1992). Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256, 1213-15.

Kang, H., Mansel, R., Jiang, W. (2005). Genetic manipulation of stromal cell-derived factor-1 attests the pivotal role of the autocrine SDF1-CXCR4 pathway in the aggressiveness of breast cancer cells. *Int J Oncol.* 26, 1429-34.

Koh, D. R., Fung-Leung, W. P., Ho, A., Gray, D., Acha-Orbea, H., Mak, T. W. (1992). Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. *Science*. 256, 1210-13

Lampert, P.W. (1978). Autoimmune and virus-induced demyelinating diseases. *Am J Pathol*. 91, 176-208.

Lassmann, H. (1998). Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult Scler* 4, 93-8

Lassmann, H., Bruck, W., Lucchinetti, C., Rodriguez, M. (1997). Remyelination in multiple sclerosis. *Mult Scler* 3, 133-6.

Lider, O., Miller, A., Miron, S., Herschkoviz, R., Weiner, H.L., Zhang, X.M., Heber-Katz, E. (1991). Nonencephalitogenic CD4-CD8- V alpha 2V beta 8.2+ anti-myelin basic protein rat T lymphocytes inhibit disease induction. *J Immunol*. 147, 1208-13.

Martin, R., McFarland, H., F. (1995). Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 32,121-82

Mosmann, T.R., Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 7, 145-73.

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S.-I., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF1. *Nature* 382, 635-38.

Pearce, E.L., Shedlock, D., Shen, H. (2004). Functional Characterization of MHC Class II-Restricted CD8⁺CD4⁻ and CD8⁻CD4⁻ T Cell Responses to Infection in CD4^{-/-} Mice. *Journal of Immunology*, 173, 2494-99.

King, D. P., Hyde, D., Jackson, K., Novosad, D., Ellis, T., Putney, L., Stovall, M., Van Winkle, L. S., Beaman, B. L., Ferrick, D. A. (1999). Protective response to pulmonary injury requires $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J. Immunol*. 162, 5033-36

Kobayashi, N., Takata, H., Yokota, S., Takiguchi, M. (2004). Down-regulation of CXCR4 expression on human CD8⁺ T cells during peripheral differentiation. *Eur. J. Immunol*. 34.

Kroemer, G., Hirsch, F., Gonzalez-Garcia, A., Martinez, C. (1996). Differential involvement of Th1 and Th2 cytokines in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 24, 25-33.

Levy, JA (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. Microbiol Rev 57, 183–289.

Linker, R., Rott, E., Hofstetter, H., Hanke, T., Toyka, K., Gold, R. (2005). EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses Neurobiol Dis. 19, 218-28

Lobell, A., Weissert, R., Eltayeb, S., de Graaf, K., Wefer, J., Storch, M., Lassmann, H., Wigzell, H., Olsson, T. (2003). Suppressive DNA vaccination in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis involves a T1-biased immune response. J Immunol. 170,1806-13.

Mason, D.Y., et al. (1992). Immunohistochemical detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence. J. Clin. Pathol. 12, 1084-8.

Matsushima et al. (2001). Blood 98: 313-321. [2275]

Matsuzaki, S., Shinozaki, K., Kobayashi, N., Agematsu, K. (2005). Polarization of Th1/Th2 in human CD4 T cells separated by CD62L: analysis by transcription factors. Allergy. 60, 780-7.

McMichael, A.J., Rowland-Jones, S. L., eds. (1987). Leukocyte Typing. Oxford University Press. 788-817.

Meinl, E., Hoch, R.M., Dornmair, K., Malefyt, R.D., Bontrop R.E., Jonker, M., Lassman, H., Hohlfeld, R., Wekerla, H., Thart, B.a. (1997). Encephalogenic potential of myelin basic protein-specific T cells isolated from normal rhesus macaques (1997). AM. J. Pathos., 150, 445-453.

Merritt, E.A., Murphy, M.E. (1994). Raster3D version 2.0, a program for photorealistic molecular graphics. Acta Crystallogr., D50, 869–73.

Muhallab, S., Dahlman, I., Wallström, E. (2005). Disparate MHC class II haplotypes in myelin oligodendrocyte glycoprotein- and myelin basic protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuro Immunol. 161, 155-61.

Parrish-Novak, J., Dillon, S., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J. Et al (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. Nature 408, 57.

Pender, M.,P., Nguyen K.,B., Willenborg, D.,O. (1989). Demyelination and early remyelination in experimental allergic encephalomyelitis passively transferred

with myelin basic protein-sensitized lymphocytes in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 25, 125-42.

Peng, S., Madaio, M., Hayday, A., Craft, J. (1996). Proagation and regulation of systemic autoimmunity by $\gamma\delta$ T cells. *J. Immunol.* 157, 4689-98

Pettersson, Å., Wu, X., Ciumas, C., Lian, H., Chirsky, V., Huang, Y., Bjelke, B., Link, H., Xiao, B. (2004). CD8⁺ dendritic cells and immune protection from experimental allergic encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 137, 486-95.

Rabin, R. L., Park, M. K., Liao, F., Swofford, R., Stephany, D., Farber, J. M. (1999). Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J. Immunol.* 162, 3840–50.

Roberts, S. J., Smith, A., West, A., Wen, L., Findly, R., Owen, M., Hayday, A. (1996). T-cell $\alpha\beta$ ⁺ and $\gamma\delta$ ⁺ deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 11774-79

Romagnani, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 18, 263–6.

Rosati, G. (1994). Descriptive epidemiology of multiple sclerosis in Europe in the 1980s: a critical overview. *Ann Neurol* 36, Suppl 2:S164-74.

Schild, H., Mavaddat, N., Litzenger, C., Ehrlich, E., Davis, M., Bluestone, J., Matis, L., Draper, R., Chien, Y.-H. (1994). The nature of major histocompatibility complex recognition by $\gamma\delta$ T-cells. *Cell* 76, 29-37

Scimone, M. L., Felbinger, T. W., Mazo, I. B., Stein, J. V., Von Andrian, U. H., Weninger, W. (2004). CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive Tcells, in peripheral lymph nodes. *J. Exp. Med.* 199, 1113–20.

Sharp, L., Jameson, J., Cauvi, G., Havran, W.L. (2004). Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nat Immunol.* [Epub ahead of print]

Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T. And Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495–500.

Skundric, D., Dai, R., Zakarian, V., Bessert, D., Skoff, R., Cruikshank, W., Kurjakovic, Z. (2005). Anti-IL-16 therapy reduces CD4⁺ T-cell infiltration and improves paralysis and histopathology of relapsing EAE. *J Neurosci Res.* 79, 680-93.

Sospedra, M., Martin, R. (2005). Immunology of Multiple Sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 683–747.

Stanislaus, R., Gilg, A., Singh, A., Singh, I. (2005). N-acetyl-L-cysteine ameliorates the inflammatory disease process in experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J Autoimmune Dis.* 2, 4

Sunnemark, D., Eltayeb, S., Nilsson, M., Wallstrom, E., Lassmann, H., Olsson, T., Berg, A.L., Ericsson-Dahlstrand, A. (2005). CX3CL1 (fractalkine) and CX3CR1 expression in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis: kinetics and cellular origin. *J Neuroinflammation.* 2, 17

Tanaka, Y., Morita, C., Nieves, E., Brenner, M., Bloom, B. (1995). Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature* 375, 155-58

Tashiro, K., Tada H., Heilker R., Shirozu M., Nakano T., Honjo T. (1993). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 261, 600.

Tomiyama, H., Matsuda, T., Takiguchi, M. (2002). Differentiation of human CD8⁺ T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J. Immunol.* 168, 5538–50.

Trowbridge, I. S., Thomas, M. L. (1994). An emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12: 85-116.

Wallström, E. 2000. Genetic regulation of, and autoimmunity in, myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. Doktorsavhandling vid Karolinska Institutet Diss: 00:146; ISBN: 91-628-4067-3

Wegner, S.A., Ehrenberg, P.K., Chang, G., Dayhoff, D.E., Sleeker, A.L., Michael, N.L. (1998). Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem.* 273, 4754-60

Weissert, R., de Graaf, K. L., Storch, M.K., Barth, S., Linington, C., Lassmann, H., Olsson, T. (2001). MHC Class II-Regulated Central Nervous System Autoaggression and T Cell Responses in Peripheral Lymphoid Tissues Are Dissociated in Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 166, 7588-7599

Weissert, R., Wallstrom, E., Storch, M.K., Stefferl, A., Lorentzen, J., Lassmann, H., Linington, C., Olsson, T. (1998). MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. *J Clin Invest.* 15; 102, 1265-73.

Xiao, B., Huang, Y., Xu, L., Ishikawa, M., Link, H. (1999). Mechanisms of recovery from experimental allergic encephalomyelitis induced with myelin basic protein peptide 68-86 in Lewis rats: a role for dendritic cells in inducing apoptosis of CD4+ T cells. *J Neuroimmunol.* 97, 25-36.

Zhang, X., Wang J.F., Matczak E., Proper J.A., Groopman J.E. (2001). Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1; 97, 3342-8

Zhang, B., Yamamura, T., Kondo, T., Fujiwara, M., Tabira, T., (1997). Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J. Exp. Med.* 186, 1677.

27 Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. med. Robert Weissert für die Anregung zu dieser Arbeit, für seine zahlreichen Ideen bei der Planung der Experimente und für die freundliche und stets motivierende Hilfe bei der Durchführung und Fertigstellung meiner Doktorarbeit.

Das Promotionsstudium wurde durch ein Promotionsstipendium des interfakultären IZKF nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz unterstützt, wofür ich mich an dieser Stelle ebenso herzlich bedanke.

Dank gilt selbstverständlich auch meinen Eltern, die mir besonders im letzten Studienabschnitt beide mit voller Kraft beistanden, so dass ich mich dem Studium und meinen Kindern widmen konnte.

28 Lebenslauf:

Kathrin Mathilde Schumann

geboren am 29. April 1981 in Stuttgart

Schulbildung

1987 – 1991	Grundschule Beutelsbach
1991 – 2000	Privates Mädchengymnasium St. Agnes in Stuttgart

Studium

Seit SS 2001	Studium der Humanmedizin, Eberhard Karls Universität Tübingen
03/ 2003	Promotionsstipendium des interfakultären IZKF für das Promotionsstudium in der experimentellen Neuroimmunologie der Universität Tübingen
03-04/ 2005	Famulatur in der Neurochirurgie am Harborview Medical Center, Seattle, USA
02/ 2007 – 01/2008	Praktisches Jahr in der Chirurgischen, Medizinischen und Gynäkologischen Klinik des Klinikums Bad Cannstatt in Stuttgart (Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen)
06. 11. 2008	Ärztliche Prüfung