

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig

**Untersuchungen zur Blockade des Makrophagen-
Migrations-Inhibitionsfaktors
in der Experimentellen Autoimmunen
Enzephalomyelitis**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Claudia Maria Denking
aus Ehingen (Donau)**

Würzburg, März 2006

Widmung:

Meinen Eltern, Susanne und Max Denkinger und meinem Mentor und Freund, Dr.
Wolfgang Oppermann.

Referenten:

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Martini

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 24. APRIL 2006

Die Promovendin ist Ärztin der Humanmedizin.

I. Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AA	Aminosäuren
Abb	Abbildung
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AP	Aktivatorprotein
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
AT	Adoptiver Transfer
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CD	“Cluster of differentiation”
CFA	komplettes Freund-Adjuvans
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
cPLA	cytoplasmatische Phospholipase A
CRH	Corticoliberin
DAPI	4-6- Diamidino-2-phenylindole
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	“Dulbecco’s modified eagle’s medium”
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
ELISPOT	“Enzyme-linked ImmunoSpot Assay”
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen
FACS	“Fluorescence-activated-Cell-Sorting”, Durchflusszytometrie
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorisothiocyanat
H&E	Hämatoxylin und Eosin
ip	intraperitoneal

ICAM-1	“intercellular Cell-Adhesion-Molecule-1”
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAB	Janus-Kinase-bindendes Protein
LFA-1	“Leukocyte Function-associated Antigen-1”
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membran-attackierender Komplex
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
mAK	monoklonale Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MBP	basisches Myelinprotein
MCP	“Monocyte-chemoattractant protein”
mg	Milligramm
MHC	“Major-Histocompatibility-Complex”, Histokompatibilitätsantigen
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor
Min	Minute
MIP	“Macrophage-inflammatory protein”
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NBT	“Nitro Blue Tetrazolium”
NF- κ B	“Nuclear factor- κ B”
NO	Stickstoffmonoxid
OCT	“Optimum Cutting Temperature”, optimale Schneidetemperatur
OVA	Ovalbumin
PAG	Proliferation-assoziiertes Gen
PBMC	“peripheral Blood-Mononuclear-Cells”
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCAM-1	“Platelet-Cell-Adhesion-Molecule-1”

PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PLP	Proteolipid-Protein
PPD	“purified Protein Derivative”
PT	Pertussis-Toxin
RAG	rekombinationsaktivierendes Gen
rpm	“Rotations per minute”, Umdrehungen pro Minute
TGF	“Transforming-Growth-Factor”
Th	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
TUNEL	“terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling”
TZR	T-Zell-Rezeptor
VCAM-1	“vascular Cell-Adhesion-Molecule-1”
VLA-4	“late Activation-Antigen-4”
ZNS	zentrales Nervensystem
ZTL	zytotoxische Lymphozyten
µl	Mikroliter

I. Gliederung

1	<u>EINLEITUNG.....</u>	1
1.1	MULTIPLE SKLEROSE	1
1.1.1	URSACHEN DER ERKRANKUNG.....	1
1.1.2	PATHOGENESE.....	1
1.1.3	PATHOLOGIE	5
1.1.4	SYMPTOME DER ERKRANKUNG	6
1.1.5	KLINISCHER VERLAUF	7
1.1.6	DIAGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGEN	8
1.1.7	BEHANDLUNG	9
1.2	DAS MAUSMODELL: EAE	11
1.3	DAS „COMEBACK“ EINES ZYTOKINS	13
1.3.1	MIF-PRODUKTION UND -SEKRETION.....	13
1.3.2	MIF-STRUKTUR	14
1.3.3	ENZYMATISCHE AKTIVITÄT.....	15
1.3.4	MIF IN DER ERWORBENEN IMMUNITÄT	16
1.3.5	MIF IM ANGEBORENEN IMMUNSYSTEM.....	17
1.3.6	MOLEKULARE MECHANISMEN DER MIF-WIRKUNGEN	19
1.3.7	MIF IN KRANKHEITSMODELLEN.....	23
2	<u>METHODEN.....</u>	25
2.1	TIERE, ANTIGENE UND IMMUNISIERUNGEN	25
2.2	KLINISCHE EVALUATION DES KRANKHEITSVERLAUFS.....	25
2.3	ZYTOKIN-MESSUNGEN MIT HILFE DES ELISPOT.....	26
2.3.1	DIE DURCHFÜHRUNG DES ELISPOT	26
2.3.2	COMPUTER-ASSISTIERTE ELISPOT-ANALYSE.....	28
2.4	ELISA	29
2.5	ADOPTIVER TRANSFER VON PLPP139-151-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN.....	31
2.6	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)	31
2.6.1	VORBEREITUNG DER ZELLEN.....	31
2.6.2	FACS-ANALYSE	32
2.7	H&E-FÄRBUNG	34

2.8	IMMUNOFLUORESCENZ-FÄRBUNG UND ZELLZAHLBESTIMMUNG	34
2.9	EVALUATION DER FÄRBEINTENSITÄT	35
2.10	TUNEL-ASSAY	35
2.11	STATISTIK	37
3	<u>UNTERSUCHUNGSGUT.....</u>	38
3.1	VERSUCHSTIERE	38
3.1.1	SJL/J-MÄUSE	38
3.1.2	C57BL/6J-MÄUSE.....	38
3.2	MATERIAL.....	38
3.2.1	IMMUNISIERUNGSREAGENZIEN.....	38
3.2.2	ELISPOT	39
3.2.3	ELISA	41
3.2.4	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)	42
3.2.5	H&E-FÄRBUNG.....	43
3.2.6	IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG	43
3.2.7	APOPTOSE-BESTIMMUNG.....	44
4	<u>ERGEBNISSE.....</u>	45
4.1	BEHANDLUNG DER AKUTEN EAE MIT ANTI-MIF-MAK	45
4.2	HISTOPATHOLOGIE DES ZNS	49
4.3	T-ZELL-INFILTRATION IN DAS ZNS	51
4.4	ANDERE MODELLE UND NEUROANTIGENE.....	53
4.5	ADHÄSIONSMOLEKÜLE UND T-ZELL-MIGRATION INS ZNS.....	54
4.6	ANTI-MIF-MAK-WIRKUNG AUF SPEZIFISCHE T-ZELLEN	57
4.7	PATHOGENITÄT DER NEUROANTIGEN-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN	59
4.8	AKTIVIERUNGSSCHWELLE VON SPEZIFISCHEN T-ZELLEN	60
4.9	APOPTOSE IM T-ZELL-POOL	64
4.10	LANGFRISTIGE WIRKUNG VON ANTI-MIF-MAK IM ZNS	64
4.11	T-ZELLEN UND ANDERE MIF-SEZERNIERENDE ZELLEN.....	65
5	<u>DISKUSSION.....</u>	69
5.1	MIF UND ADHÄSIONSMOLEKÜLE.....	69

5.2	MIF UND T-ZELLEN	70
5.3	MIF UND ZYTOKINE.....	72
5.4	MIF UND GLUKOKORTIKOIDE	73
5.5	MIF IN “PRIMING“ UND EFFEKTORPHASE VON T-ZELLEN.....	76
5.6	MIF ALS THERAPEUTISCHER ANGRIFFPUNKT	77
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	79
III.	<u>LITERATUR.....</u>	80

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Erkrankung der weißen Substanz des zentralen Nervensystems (ZNS), die die höchste Inzidenz unter Menschen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr hat. Die Prävalenz beträgt in Europa und Nordamerika etwa 80-120 Fälle pro 100.000 Einwohner. Frauen erkranken etwa doppelt so häufig wie Männer. In Entwicklungsländern ist die MS eine seltene Erkrankung (111).

1.1.1 Ursachen der Erkrankung

Das ausgeprägte Nord-Süd-Gefälle in der Prävalenz der MS kann durch genetische und umweltbedingte Einflüsse erklärt werden. Für starke Umwelteinflüsse in der Pathogenese spricht das Auftreten von schnellen Veränderungen in der Inzidenz, wie zum Beispiel auf den Färöer-Inseln zwischen 1943 und 1960 während der britischen Besatzung (73). Die Bedeutung genetischer Einflüsse wird durch die Konkordanzrate von eineiigen Zwillingen unterstützt, die etwa sechsmal höher ist als die von zweieiigen Zwillingen. Als genetische Faktoren konnten bisher das HLA-DR2-Allel und in einer kleinen Subpopulation das HLA-DQ6-Allel gesichert nachgewiesen werden. Varianten des Interleukin-1-Rezeptors und der Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten-Gene sowie des Immunglobulin-Fc-Rezeptor-Gens und des Apolipoprotein-E-Gens werden mit Unterschieden in der Ausprägung der Erkrankung in Verbindung gebracht (111).

1.1.2 Pathogenese

Die MS hat eine sehr heterogene Klinik und Pathologie. Dies führt zu der Annahme, dass mehr als ein pathogenetischer Mechanismus an der Gewebeerstörung beteiligt sein muss. Diese Annahme hat klinische Implikationen, da man davon ausgehen kann, dass eventuell mehrere Mechanismen therapeutisch angegangen werden müssen, um die Erkrankung erfolgreich zu behandeln.

1.1.2.1 Autoreaktive T-Zellen

Man findet bei Patienten mit MS, wie auch bei gesunden Versuchspersonen, CD4⁺-T-Zellen, die sich gegen verschiedene Myelin- oder Nicht-Myelin-Antigene richten. Zu diesen Antigenen gehören unter anderen das basische Myelinprotein (MBP), das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG), das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), das Proteolipid-Protein (PLP), das $\alpha\beta$ -Crystallin und das S-100-Protein (123). Mausmodelle, in denen die Injektion eines Antigens zusammen mit komplettem Freund-Adjuvans (CFA) eine der MS ähnliche Erkrankung, die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), auslöst, sind zum Beispiel für PLP, MBP und MOG etabliert (96; Kapitel 1.2). Im Unterschied zu gesunden Versuchspersonen findet man bei MS-Patienten autoreaktive T-Zellen in größerer Zahl, mit erhöhtem Aktivierungszustand und geringerer Abhängigkeit von der B7-Kostimulation durch PBMC (87, 110).

In den letzten Jahren sind zunehmend auch CD8⁺-T-Zellen in den Fokus der Forschungsaktivität gekommen. Sowohl Sun et al. (126) als auch Goverman et al. (43) konnten in zwei unterschiedlichen EAE-Modellen mit C57BL/6 beziehungsweise CH3shiv Mäusen die wichtige Rolle von CD8⁺-T-Zellen in der Pathogenese beweisen. Weitere Erkenntnisse zur Relevanz dieser Modelle für die MS stehen noch aus.

1.1.2.2 Chemokine erleichtern die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Die aktivierten Th1-Zellen müssen ins Gehirn gelangen, um zur Demyelinisierung beizutragen. Chemokine unterstützen direkt über die Chemoattraktion und indirekt über Aktivierung von Leukozyten-Integrinen, die an Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen binden, die Einwanderung von T-Zellen und Makrophagen. Diverse α - und β -Chemokine wurden in den letzten Jahren in erhöhter Konzentration bei MS-Patienten und im EAE-Modell gefunden (60). Auch das Chemokin MIF ist im Liquor von MS-Patienten gegenüber gesunden Versuchspersonen erhöht (102).

1.1.2.3 Adhäsionsmoleküle ermöglichen die Extravasation

Die perivaskuläre Infiltration von Entzündungszellen ist eines der pathologischen Kennzeichen für MS-Läsionen im Gehirn. Die Infiltration bedarf der Adhäsion und Migration der Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke. ICAM-1, das an den Integrin-Rezeptor LFA-1 bindet und VCAM-1, das mit dem VLA-4 interagiert, spielen eine

wichtige Rolle bei der Endothel-Leukozyten-Interaktion und der Leukozyten-Extravasation (78). Erhöhte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen und ihrer Liganden auf Entzündungszellen und Mikrogliazellen wurde sowohl in akuten als auch in chronischen MS-Läsionen gefunden (25). Kuchroo et al. (1993) (71) und später Theien et al. (2001) (131) konnten zeigen, dass die Behandlung mit Anti-VLA-4-mAK vor Krankheitsausbruch den EAE-Ausbruch verhindert. Sie untermauerten damit die These, dass die Adhäsionsmoleküle entscheidend in die Pathogenese von EAE eingebunden sind. Analog dazu spricht die in den USA neu zugelassene Therapie für die schubförmig-remittierende MS mit einem alpha4-Integrin-Antagonisten des VLA-4 für die Bedeutung der VLA-4/VCAM-1-Interaktion in der Pathogenese der MS.

1.1.2.4 Matrixmetalloproteinasen zerstören die Basalmembran

Matrixmetalloproteinasen (MMP) umfassen eine Familie von streng regulierten proteolytischen Enzymen, die in die extrazelluläre Matrix sezerniert werden. MMP werden von Entzündungszellen und Mikrogliazellen produziert und sind bei MS-Patienten erhöht (41). Sie zerstören die Basalmembran der Blut-Hirn-Schranke und erleichtern dadurch die Extravasation der Entzündungszellen. Sie bauen außerdem die extrazelluläre Matrix ab und ermöglichen die weitere Infiltration ins Neuropil. Ferner spalten und aktivieren sie membrangebundene Zytokine wie TNF α und schädigen direkt die Myelinscheide (63). Inflammatorische Zytokine sind in der Lage, die Expression von MMP zu induzieren, während Kortikosteroide die MMP-Konzentration vermindern. IFN- β 1b inhibiert unter anderem die T-Zell-Sekretion von MMP, wodurch die Progression der Erkrankung bei Patienten vermindert werden kann (83).

1.1.2.5 B7-1 aktiviert Myelin-reaktive T-Zellen

Auch kostimulatorische Moleküle spielen eine Rolle in der Pathogenese der MS (58). Es bedarf zum einen des Antigen-spezifischen Signals und zum anderen des kostimulatorischen Signals, um die Myelin-reaktiven T-Zell-Klone zu aktivieren, die sowohl in Gesunden als auch in MS-Patienten vorhanden sind. Auf APZ sind die kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 vorhanden, die mit CTLA-4 (Aktivierungshemmung) und CD28 (Aktivierung) auf T-Zellen interagieren. Die Behandlung mit anti-B7-1-mAK während der Induktion von EAE schützt Mäuse vor

der Erkrankung, während die Gabe von anti-B7-2-mAK den Krankheitsverlauf verschlechtert (70). Diese Ergebnisse gehen einher mit einer verstärkten Th2-Antwort nach anti-B7-1-mAK-Behandlung im Gegensatz zu einer Th1-Antwort nach Verabreichung von anti-B7-2-mAK. Interessanterweise bewirkt die Behandlung mit IFN β -1b eine Reduktion der Frequenz der B7-1-exprimierenden B-Zellen, was die Theorie unterstützt, dass B7-1 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS spielt.

1.1.2.6 MBP-reaktive T-Zellen produzieren vermehrt TNF α , IFN- γ und IL-12

Es gibt Hinweise dafür, dass Th1-assoziierte Zytokine, TNF α , IFN- γ und vor allem IL-12, während der akuten Phase der MS erhöht sind und bei zusätzlicher externer Applikation den Krankheitsverlauf verschlechtern können. Die Anzahl an T-Zellen, die Th2-Zytokine exprimieren, ist bei MS-Patienten und normalen Individuen gleich (82).

1.1.2.7 Molekulares Mimikry induziert die Aktivierung autoreaktiver T-Zell-Klone

Auch molekulares Mimikry wird seit Jahren als ein Mechanismus der Induktion und Verschlechterung der MS diskutiert (38). Die Hypothese geht dabei von einem infektiösen Agens aus, das T-Zellen aktiviert. Diese T-Zellen überwinden die Blut-Hirn-Schranke, erkennen Autoantigene in der Myelinscheide und induzieren eine Entzündungsreaktion, die die Destruktion des Myelins zur Folge hat. Virale und bakterielle Epitope, die MBP-reaktive T-Zellen aktivieren, wurden identifiziert (142). Bei den Viren stand zuletzt die Herpesvirus-Gruppe im Verdacht, während bei den Bakterien *Chlamydia pneumoniae* im Mittelpunkt der Diskussion steht.

Auf der Grundlage des molekularen Mimikry konnte ein Tiermodell etabliert werden. Die Infektion mit dem „Theiler’s murine encephalomyelitis virus“, das den Picornaviren verwandt ist, löst in genetisch bedingt empfänglichen Mäusen EAE aus (30).

1.1.2.8 „Epitope spreading“ als Mechanismus für die Chronifizierung

„Epitope spreading“ als pathogenetischer Mechanismus in der MS und in der EAE spielt vor allem eine Rolle für den schubförmig-remittierenden Verlauf und die Chronifizierung der Erkrankung (133). Während sich zu Beginn der Erkrankung die Immunantwort gegen immunodominante Epitope der Myelin-Antigene richtet, breitet

sich die Immunantwort im weiteren Verlauf auf andere Antigene aus. Diese werden vermutlich aufgrund der destruktiven Entzündungsreaktion freigesetzt und unterhalten den schubweisen Verlauf der Immunreaktion (80). Man kann also von einer sequentiellen Ansammlung der sich entwickelnden Autoreaktivität sprechen, wobei möglicherweise das Ausmaß des “Epitope spreading” zum Verlauf der Erkrankung in Beziehung gesetzt werden kann (132, 145).

1.1.2.9 Autoantikörper unterstützen den Myelinabbau

Auch Autoantikörpern wird in der Pathogenese der MS eine Rolle zugesprochen. Sie können durch Aktivierung des Komplementsystems direkt zu einer Zytolyse und damit zu einem Myelindefekt führen. Antikörper gegen MBP und MOG findet man in den Läsionen im ZNS und im Liquor von MS-Patienten (113, 125).

Exemplarischer Vergleich von experimentell therapeutischen Ansätzen in der MS und in Modellen der CD4⁺-T-Zell-vermittelten EAE:

<i>Therapie</i>	<i>MS</i>	<i>EAE</i>
Systemisches IFN- γ	Verschlechterung	Heilung
Anti-IFN- γ -mAK	Nicht durchgeführt	Verschlechterung
Systemisches TNF α	Nicht durchgeführt	Heilung
Anti- α 4-Integrin-mAK	Verbesserung	Verbesserung
Anti-CD4-mAK	Verbesserung	Heilung

Viele Mechanismen scheinen in der Pathogenese der MS wichtig zu sein. Problematisch für die Erforschung der Mechanismen sind die offensichtlichen Limitationen der verschiedenen EAE-Modelle, die sich in vielen Aspekten untereinander und von vergleichbaren Studien in MS-Patienten unterscheiden. Entscheidende Fortschritte in der Aufklärung der Pathogenese bringen oft auch neue Erkenntnisse im Bereich der Diagnostik und Therapie.

1.1.3 Pathologie

Die Demyelinisierung der Axone blockiert die schnelle Fortleitung der Impulse und verursacht dadurch wahrscheinlich die Symptome der frühen MS. Der Rückgang der

Symptome in der Remission könnte durch den Rückgang der entzündlichen Schwellung und durch eine partielle Remyelinisierung bedingt sein. Andere Theorien sprechen von einem Einfluss der Zytokine auf die Nervenleitung und einer Besserung der Symptomatik durch eine Neuverteilung der Natriumkanäle über die Segmente der demyelinisierten Axone (138).

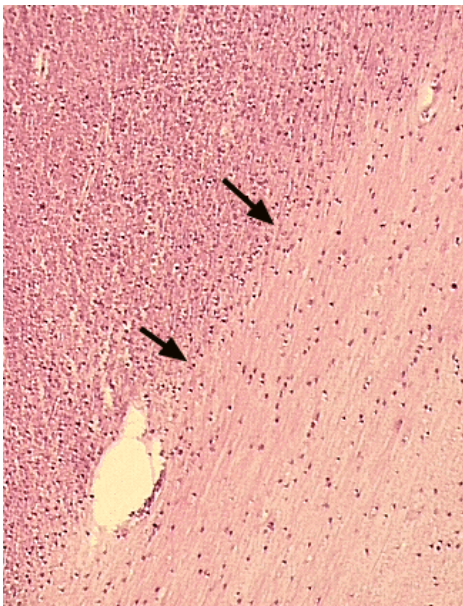


Abb. 1

Das pathologische Kennzeichen für die MS ist die demyelinisierte Läsion, die sich durch ein gut abgrenzbares hypozelluläres Gebiet (Pfeile) mit erhaltenen, aber nicht myelinisierten Axonen und Vernarbungen aus Astrozyten auszeichnet. Oft liegen mehrere mittelgroße Gefäße in der Umgebung. Im Randgebiet der Läsion findet man, abhängig vom Stadium der Erkrankung, unterschiedliche Arten von Entzündungszellen, meist Lymphozyten und Makrophagen. Prädilektionsgebiete für die Läsionen sind der Nervus opticus, die periventrikuläre weiße Substanz, der Gehirnstamm, das Zerebellum und die weiße Substanz des Rückenmarks.

1.1.4 Symptome der Erkrankung

Oft sind es schwer einzuordnende Störungen, die die Patienten zu Beginn der Erkrankung in die Klinik führen. Im Anfangsstadium findet man häufig plötzlich auftretende Sehstörungen (Neuritis des Nervus opticus mit Diplopie, Nystagmus) in Verbindung mit Lähmungserscheinungen verschiedener Extremitäten. Parästhesien sowie ein vollständiger Verlust der Sensibilität sind möglich. Das „Elektrisieren“ bei Kopfbewegungen wird Lhermittes-Zeichen genannt und wahrscheinlich durch ephaptische Phänomene im Zervikalmark ausgelöst. Außerdem fallen oft Sprachstörungen, Blasen- und Darmschwäche sowie eine Leistungsschwäche, verstärkt durch erhöhter Körper- oder Außentemperatur (Uhthoff-Phänomen), auf. Im Verlauf der Erkrankung kommt es gehäuft zu Wahrnehmungseinschränkungen, zu emotionaler Labilität bis hin zu Depression, Dysarthrie und Vertigo sowie zu fortschreitender Tetraparese, Ataxie, Spastizität und zu Schmerzen. Der individuell sehr unterschiedliche Verlauf bedingt in Einzelfällen eine späte Diagnosestellung.

Während frühere diagnostische Kriterien („Poser-Kriterien“) ausschließlich auf klinischen Angaben basierten, schließen die neueren, in einem internationalen Konsens gefundenen “McDonald-Kriterien“ auch sogenannte paraklinische Ergebnisse aus bildgebenden Untersuchungen (MRT), elektrophysiologischen Untersuchungen (vor allem evozierte Potentiale) und Liquoruntersuchungen (vor allem oligoklonale Banden) mit ein (90). Grundsätzlich steht für die Diagnosestellung „MS“ weiterhin der objektive Nachweis einer zeitlichen und topografischen Dissemination des Krankheitsprozesses im Vordergrund.

1.1.5 Klinischer Verlauf

Klinisch sind drei Verlaufsformen für die MS bekannt (111):

1. Schubförmig-remittierende Form:

Macht etwa 70% der Fälle aus. Die Symptome entwickeln sich über mehrere Tage bis zur vollen Ausprägung und stabilisieren sich dann, um entweder spontan oder in Folge einer Kortison-Behandlung wieder fast vollständig zu verschwinden. Der erste Symptomschub tritt meist in der zweiten oder dritten Lebensdekade auf. Frauen sind etwa zweimal häufiger betroffen als Männer.

2. Sekundär-progrediente Form

Ein Großteil der zunächst schubweisen Verlaufsformen entwickelt sich im Laufe der Krankheitsjahre zu einer sekundär-progredienten Form. Dabei wird der körperliche Zustand der Patienten immer schlechter und die Remission zwischen den Schüben ist unvollständig.

3. Primär-progrediente Form

Etwa 10 % der Betroffenen, Frauen zum gleichen Anteil wie Männer, weisen eine primär-progrediente Form auf, die durch ein langsames, aber kontinuierliches Fortschreiten der Erkrankung gekennzeichnet ist.

Die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Verlaufsformen und diversen Sonderformen, wie zum Beispiel: der konzentrischen Sklerose (Baló) oder der Neuromyelitis optica (Dévic), ist besonders zu Beginn der Erkrankung schwierig. Die Übergänge sind fließend. Es ist weiterhin unklar, ob es sich nicht auch um verschiedene Erkrankungen mit einem ähnlichen klinischen Bild handeln könnte.

1.1.6 Diagnostische Untersuchungen

Folgende Untersuchungen kommen in der Diagnostik zur Anwendung:

1. Liquoranalyse

Die Liquoranalyse ist prinzipiell eine unspezifische Untersuchung, da auch andere Entzündungsreaktionen im Gehirn ähnliche Veränderungen hervorrufen können.

Marker im Liquor	Patient (Pt) mit MS	Pt mit ZNS-Infekt (bakt.)	gesunder Pt (Norm)
Erythrozyten	0 Zellen/ μ l	\pm	0 Zellen/ μ l
Leukozyten	+ (1/3 der Patienten)	+++	< 6 Zellen/ μ l
Protein	+ (1/4 der Patienten)	++	120 - 500 mg/l
MBP	++ (Demyelinisierung)	\pm	\pm 0mg/ml
IgG Synthese ¹	+++ (80-90%)	++ (30-50%)	+ (12%)
Oligoklonale Immunglobulin-Banden ²	++ (90%)	+	+ (7%)

Legende: ¹ Prozentanteil am Gesamtprotein, ² Anteil an Patienten mit positivem Befund.

2. Visuell, auditorisch oder somatosensorisch evozierte Potentiale sowie die transkranielle Magnetstimulation

Typischerweise findet man bei MS-Patienten eine Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit aufgrund einer Demyelinisierung der Axone. Auch erniedrigte Amplituden der Reizantwort können vorkommen. Sie werden auf einen zusätzlichen axonalen Schaden zurückgeführt.

3. Magnet-Resonanz-Tomografie (MRT)

Die Technik der MRT ist nach den neuen McDonald-Diagnosekriterien (90) ein entscheidendes Hilfsmittel zur Stellung der Diagnose. Während die T2-Gewichtung eine gute Lokalisation der Läsionen ermöglicht, gelingt mit der T1-Gewichtung oder mit Weiterentwicklungen der MRT, wie der DW-MRT

(“diffusion-weighted”) oder der MT-MRT (“magnetization transfer”) eine Abschätzung der strukturellen Schäden, wie etwa der Demyelinisierung in den Läsionen (117). Außerdem dient die MRT der Beurteilung des Krankheitsverlaufs und des Therapieerfolgs.

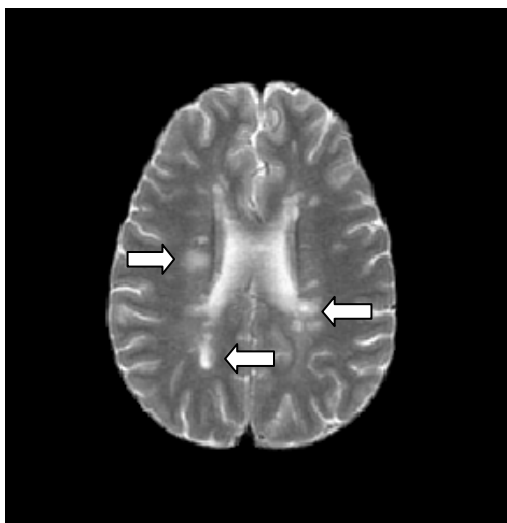


Abb. 2

MRT mit paramagnetischem Kontrastmittel bei einer 33 Jahre alten Patientin mit schubweise-remittierender MS. T2-gewichteter axialer Schnitt. Konfluierende, hyperdense Läsionen im periventriculären Bereich deuten auf eine fortgeschrittene Manifestation der Erkrankung hin. Neue Läsionen können nach einiger Zeit in Folge von Reparaturprozessen wieder kleiner werden oder völlig verschwinden. (Quelle: Archiv der CWRU)

4. Blutanalyse

Die Blutanalyse dient dem Ausschluss anderer Ursachen für die bestehende Symptomatik (unter anderem Kollagenosen: Antinukleäre Antikörper, Sarkoidose: Angiotensin Converting Enzyme, Borreliose: Antikörper-Nachweis).

1.1.7 Behandlung

Über lange Zeit waren Glukokortikoide die einzige Behandlungsmöglichkeit für MS, da sie die Erholung der Patienten nach einem Krankheitsschub fördern können und zu einer schnellen Rückbildung frischer Entzündungsherde führen. Sie werden möglichst früh zu Beginn eines Krankheitsschubs verabreicht. Bei Patienten, die nicht auf Steroide ansprechen, kann ein Plasma-Austausch versucht werden.

In der Langzeitbehandlung sind heute weitere Substanzen zugelassen: Für die schubförmig-remittierende Erkrankung sind dies IFN- β 1b, IFN- β 1a (42, 118), Glatirameracetat (118) und Azathioprin (146). Alle vier Medikamente führen zu einer Verringerung der Anzahl an Krankheitsschüben und neuen Läsionen im Gehirn.

Für eine Behandlung mit IFN- β 1a konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung einer klinisch eindeutigen MS (also die Manifestation eines zweiten Schubs) nach einer ersten Episode der Demyelinisierung verzögert ist. Die Interferone haben vermutlich eine verminderte Expression von MHC-Molekülen auf der Oberfläche von APZ und eine herabgesetzte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zur Folge. Außerdem bewirken sie eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen und MMP, welche die Extravasation von aktivierten Lymphozyten und Makrophagen ins ZNS vermitteln. Glatiramerazetat, ein synthetisches Polypeptid, das dem MBP ähnelt, induziert wahrscheinlich CD25⁺-regulatorische Zellen aufgrund der Expression von gemeinsamen Determinanten mit MBP. Außerdem bindet es MHC-Moleküle auf der Oberfläche von APZ (57). Weiterhin bewirkt das Medikament eine vermehrte Produktion von Th2-Zytokinen sowie eine Ausschüttung des Neurotrophins „brain-derived neurotrophic factor“ (148). Auch Azathioprin wird eine schubreduzierende Wirkung zugesprochen (146).

In 2004 wurde ein weiteres Medikament für die schubförmig-remittierende Erkrankungsform von der „Food and Drug Administration“ in den USA zugelassen: Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der an die alpha-4-Untereinheit des VLA-4 auf der Oberfläche von Leukozyten bindet und dadurch die Interaktion mit VCAM auf der Oberfläche des Endothels und die Extravasation von Leukozyten verhindert (18, 26, 50, 105). Das Medikament zeigte in zwei noch laufenden, Placebo-kontrollierten Studien in Monotherapie (AFFIRM Studie) oder in Kombination mit IFN- β 1a (Avonex) (SENTINEL Studie) eine signifikante Reduktion in der Schubrate über ein Jahr. Die Zulassung des Medikaments in Deutschland steht noch aus.

Für die Behandlung der sekundär-progredienten MS sind IFN- β 1b (42, 118) und Mitoxantron (45, 118) zugelassen. Sie verlangsamen das Fortschreiten der Symptomatik. Mitoxantron agiert vermutlich als T- und B-Zell-Immunsuppressor. Die genaueren immunologischen Wirkmechanismen sind aber nicht bekannt. Es wird bei der hoch aktiven sekundär-progredienten MS, aber auch bei der schweren schubförmig-remittierenden MS eingesetzt. Außerdem findet Cyclophosphamid, ein Zytostatikum mit immunsuppressiver Wirkung, vor allem bei der rasch voranschreitenden chronisch-progredienten MS in der Klinik Verwendung (139). Methotrexat, ebenfalls ein Immunsuppressivum, wird meist nur zur Stabilisierung der Koordinationsfunktionen

bei chronisch-progredienter MS eingesetzt. Eine eventuelle Anwendung in der Kombinationstherapie mit IFN wird diskutiert (20). Für die primär-progressive MS ist bisher nur eine symptomatische Behandlung zugelassen.

Immer noch fehlt es an effektiven Medikamenten, auf die ein höherer Anteil der Patienten anspricht. Die IFN-Behandlung ebnete den Schritt zur Immuntherapie. Weitere Forschung auf diesem Gebiet wird vorangetrieben. Zu nennen wären die "Altered Peptide Ligands": der Versuch, durch die Gabe von modifizierten immunodominanten Peptiden Toleranz zu induzieren (14, 29, 56, 124). Außerdem findet die Behandlung mit Antikörpern, die sich gegen proinflammatorische Zytokine oder andere Mediatoren der Entzündung richten, viel Unterstützung. Als mögliche Ansätze wären Campath (Anti-CD52-mAK) oder Daclizumab (Anti-IL-2-Rezeptor-mAK) zu nennen. Immunomodulatorisch wirken auch die bereits in Phase drei beziehungsweise zwei stehenden Medikamente Teriflunomide (Pyrimidinsynthese-Inhibitor) oder Cladribine (Purinanalogon).

Die Gabe von anti-MIF-mAK stellt ebenfalls eine hypothetische Möglichkeit der Therapie dar und zeigt in Modellen anderer Autoimmunkrankheiten, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis, bereits vielversprechende Ergebnisse. Eine Wirkung des Antikörpers auf den Verlauf von EAE beziehungsweise MS wurde bislang nicht untersucht.

1.2 Das Mausmodell: EAE

EAE in Mäusen ist das am besten charakterisierte Modell für organspezifische, T-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheiten. Die Erkrankung wird durch Immunisierung mit MBP, PLP, MOG oder deren immunodominanten Peptide, spezifisch für jeden Mausstamm, zusammen mit CFA und eventuell zusätzlich Pertussis-Toxin (PT) induziert (96). Etwa zwei Wochen nach der Immunisierung zeigen sich die ersten Symptome der Enzephalomyelitis. Es kommt zur Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten ins Hirngewebe.

Es ist etabliert, dass CD4⁺-T-Zellen, die für das immunisierende Antigen spezifisch sind, für die Demyelinisierung und damit auch die Symptome der Erkrankung verantwortlich sind. Diese autoreaktiven T-Zellen werden im Thymus nicht negativ selektioniert. Ein Transfer, der so genannte „Adoptive Transfer“ (AT), dieser aktivierten

autoreaktiven CD4⁺-T-Zellen führt zur raschen Entwicklung von EAE in nicht immunisierten Tieren. Die pathogenen CD4⁺-T-Zellen können Teil der IFN- γ und IL-2 produzierenden Th1-Population (72) oder der IL-4 und IL-5 produzierenden Th2-Population sein (74). Auch CD8⁺-T-Zellen scheinen nach jüngeren Erkenntnissen eine Rolle zu spielen. Dies wurde bisher in C3Hshiv-Mäusen und C57BL/6 gezeigt (52, 126, Kapitel 1.1.2.1).

Die Extravasation der T-Zellen ist von der Expression des VLA-4 auf T-Zellen und des VCAM-1 auf vaskulärem Endothel abhängig. Außerdem liefert die Interaktion zwischen VLA-4 und VCAM-1 ein kostimulatorisches Signal, das die Aktivierung der T-Zellen und die Zytokin-Produktion unterstützt (18, 26, 50).

Wie empfänglich ein Mausstamm für die Induktion der Erkrankung ist, hängt zum großen Teil vom genetischen Repertoire der Maus und vom MHC-Haplotyp ab. Spontane EAE wird in Mäusen beobachtet, die transgen für einen Myelin-Antigen-spezifischen TZR sind. Zusätzlich muss entweder ein nicht-steriles Umfeld vorhanden sein (43), oder es muss das RAG-1-Protein fehlen, das für das V-DJ-Rearrangement der variablen Antikörperenden verantwortlich ist (75).

In den folgenden Experimenten wurden zwei etablierte Modelle der EAE verwendet. Für das eine Modell mit SJL-Mäusen (Genotyp: H-2^s) sieht das Protokoll eine Immunisierung mit dem für diese Mäuse immunodominanten Peptid des Proteolipid-Proteins PLPp139-151 in CFA und PT vor. Im anderen Modell wird MOG 35-55 (91), CFA und PT in C57BL/6J-Mäuse (Genotyp: H-2^b) injiziert. In beiden Modellen zeigen die Mäuse einen schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf, der sich gut anhand der folgenden Skala beurteilen lässt.

Die Ausprägung der Erkrankung wird in fünf Stadien eingeteilt:

Grad 1	Schwäche im Schwanz und in den Hinterbeinen
Grad 2	Partielle Paralyse der Hinterbeine
Grad 3	Komplette Paralyse der Hinterbeine
Grad 4	Tetraplegie und moribunder Status
Grad 5	Tod

1.3 Das „Comeback“ eines Zytokins

Nach über vier Jahrzehnten Forschung ist der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) mittlerweile zu einem wichtigen Bestandteil der Immunologie geworden. Obwohl seine genaue Wirkung auf die meisten Zellen noch nicht geklärt ist, gilt er als ein wichtiger Regulator in der Signalkaskade der angeborenen und erworbenen Immunität.

Bekannt wurde das Chemokin erstmals in den späten 50er-Jahren. Der Name leitet sich von der ersten erforschten Funktion des Proteins ab: der Inhibition der Migration von Makrophagen. Bereits 1966 erkannten Bloom/Bennett (16) und David (35) unabhängig voneinander, dass T-Lymphozyten eine Hauptquelle für das lösliche Chemokin darstellen. In den folgenden 20 Jahren kamen nur wenige neue Erkenntnisse hinzu. MIF wurden unter anderem Funktionen bei der Makrophagen-Aktivierung und bei der Phagozytose-Induktion zugeschrieben (99, 100, 107).

Vor allem aber die Klonierung einer cDNA für humanes MIF 1989 (140) und die Herstellung von neutralisierenden Antikörpern (13) hat die Forschung auf diesem Gebiet entscheidend vorangebracht und eine differenzierte Analyse der biologischen, biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften und Funktionen des Proteins ermöglicht.

1.3.1 MIF-Produktion und -Sekretion

Das MIF-Gen wurde dem Chromosom 10 zugeordnet. Es enkodiert für ein 12-kDa Protein mit 115 Aminosäuren (127). Genetische Polymorphismen für einzelne Nukleotide oder Tetranukleotid-Repeats (CATT) in der Promotorregion des Gens wurden mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für die entzündliche Polyarthritits assoziiert (8). Untersuchungen für die MS diesbezüglich liegen nicht vor.

MIF wird vor allem in T-Zellen und Zellen der Epiphyse produziert und gespeichert. Kleine Mengen des Proteins werden kontinuierlich von vielen Zellen des Körpers, wie zum Beispiel der Mikroglia des Gehirns (3), in unterschiedlichen Mengen hergestellt und in einem zirkadianen Rhythmus ausgeschüttet (4).

Die Freisetzung von MIF ist ein wesentlicher Bestandteil der Stressreaktion des Menschen. Hauptquelle für die Ausschüttung von MIF in Stresssituationen ist die

Epiphyse (19). Insgesamt macht MIF etwa 0,05% des gesamten Proteingehalts der Epiphyse aus (12, 21, 104). Es wird in drei Zellarten gespeichert, entweder ohne andere Hormone oder zusammen mit ACTH oder TSH (104).

Die MIF-Ausschüttung scheint, ähnlich der IL-1- oder Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Sekretion, auf einem nicht-konventionellen Weg stattzufinden (11). Details des Mechanismus sind noch nicht bekannt. Induziert wird die Sekretion von MIF in vitro durch CRH, wobei geringere Mengen an CRH benötigt werden als für die Induktion der ACTH-Ausschüttung (104). CRH fördert außerdem die Transkription von MIF in murinen pinealen Zellen.

Auch Makrophagen können, ähnlich den Zellen der Zirbeldrüse und den T-Zellen, große Mengen an MIF speichern. Sie spielen vor allem eine Rolle bei der Sekretion von MIF im Rahmen der angeborenen Immunantwort (22). Sekretionsstimulierend wirken $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, LPS und Glukokortikoide (19, 21, 22, 79). Die verstärkte MIF-Sekretion in Stresssituationen oder bei Infektionen führte zu der Annahme, dass MIF eine wichtige Rolle in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse spielt.

1.3.2 MIF-Struktur

Das Protein MIF besteht aus 115 Aminosäuren, die sich in einer einzigartigen Struktur zusammenfügen (127). Kristallographie-Studien haben gezeigt, dass MIF als Homotrimer existiert. Die drei β -Faltblatt-Domänen umgeben die sechs α -Helices und bilden eine zentrale Faserstruktur mit offenen Enden. Die Struktur beinhaltet einen im Durchmesser vier bis 15 Anström großen Kanal, der hauptsächlich aus hydrophilen, positiv geladenen Atomen besteht, so dass eine Interaktion mit negativ geladenen Molekülen vorstellbar ist. Das Protein ist in seiner Struktur einzigartig unter den Zytokinen, und es gibt bereits einige Hypothesen darüber, wie MIF an neuen Ligand-Rezeptor-Interaktionen mitwirken könnte (11, 53). Abb. 3 zeigt eine Darstellung der Struktur.

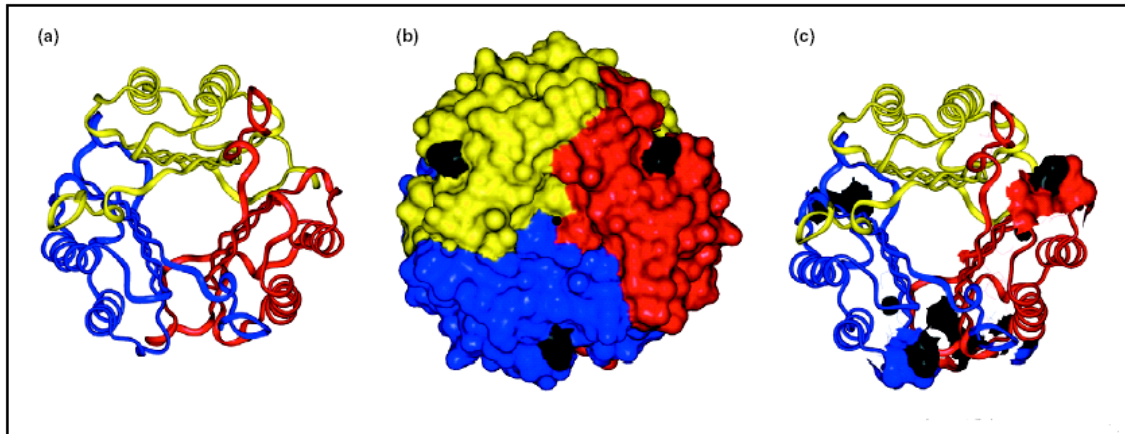


Abb. 3 MIF-Struktur

Die Abbildung zeigt (a) die Monomere des Trimers (rot, gelb und blau) in dreidimensionaler Struktur. Jedes Monomer besteht aus zwei antiparallelen α -Helices und sechs β -Faltblättern. N-terminale und C-terminale Stränge stehen jeweils in Verbindung mit den vier β -Faltblättern des nächsten Monomers, wodurch eine Faszstruktur entsteht, die von den sechs α -Helices umgeben ist. In (b) werden die dem Lösungsmittel zugängliche Fläche und die katalytischen Zentren gezeigt, in denen ein Inhibitor (schwarz) bindet. In (c) dargestellt ist die Atomstruktur und die dem Lösungsmittel zugängliche Fläche in den hoch invarianten Determinanten des Moleküls, die teilweise auch im Molekül "vergraben" sind (113).

1.3.3 Enzymatische Aktivität

Die dreidimensionale Struktur und deren Ähnlichkeit zu prokaryontischen Enzymen ließen bald auch für MIF enzymatische Aktivitäten vermuten. Mittlerweile gibt es Literatur zu katalytischen Aktivitäten des Proteins als D-Dopachrome-Tautomerase (116), Phenylpyruvate-Keto-Enol-Isomerase (115) und Thiol-Protein-Oxidoreduktase (69). Das PAG-Protein, ein thiol-spezifisches antioxidatives Protein, wurde als potentiell Substrat für MIF identifiziert (53). Dies unterstützt die Hypothese, dass MIF eventuell eine Rolle in Oxidations- und Reduktionsprozessen in der Zelle spielt. Inwieweit diese enzymatischen Funktionen aber tatsächlich eine physiologische Bedeutung haben, ist noch nicht abschließend erforscht. Bisher haben Mutationsanalysen die Enzymkapazität von MIF nicht mit dessen biologischer Bedeutung in Verbindung setzen können (47).

1.3.4 MIF in der erworbenen Immunität

Erste Beschreibungen assoziierten MIF mit der Typ-IV-Immunreaktion nach Coombs (16, 35). Heute ist bekannt, dass das Chemokin vor allem im angeborenen Immunsystem eine Rolle spielt. Dennoch ist MIF auch ein wichtiger Regulator der erworbenen Immunität.

Bei der Stimulation von T-Zellen mit Anti-CD3-Antikörpern oder Superantigen im EAE-Modell wurden die Induktion von MIF-mRNA sowie die Sekretion des Proteins dokumentiert (5, 24). Durch eine Neutralisierung des von T-Zellen produzierten MIF mittels anti-MIF-mAK konnten sowohl die anti-CD3- und Superantigen-induzierte IL-2-Sekretion verhindert als auch die T-Zell-Proliferation um 40-60 % reduziert werden (5). In vivo ist bei anti-MIF-Behandlung eine eingeschränkte T-Zell-Proliferation und eine Reduktion der Produktion von Antigen-spezifischem IgG zu beobachten (5), was auf den Einfluss von MIF auf das T-Zell-„Priming“ schließen lässt.

Sowohl Th1-Zellen als auch Th2-Zellen produzieren MIF. Die mRNA Produktion und Ausschüttung des MIF-Proteins nach Stimulation in vitro ist aber vor allem in T-Zell-Klonen des Th2-Typs erhöht (5). Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, dass die humorale Immunität durch eine MIF-Blockade mit anti-MIF-mAK in vivo gehemmt wird (5). Im Gegensatz dazu zeigen Lymphknotenzellen von MIF-Knockout Mäusen, die mit Leishmania-Antigen stimuliert wurden, keine signifikante Veränderung in der Produktion von IL-4 verglichen mit Zellen des Wildtyps (119).

Die Funktion von MIF bei der Regulation und Migration von T-Zellen, die sich gegen Tumoren richten, wurde von Abe et al. beschrieben (1). Im Mausmodell konnte mit Hilfe der OVA-transfizierten Tumorzelllinie EL4 (EG.7) gezeigt werden, dass Splenozyten von EG.7-immunisierten Mäusen höhere Spiegel an MIF nach Antigenstimulation in vitro aufweisen (1). Neutralisierung von MIF in gleichen Splenozyten-Kulturen führte zu einer signifikant verstärkten ZTL-Antwort gegen EG.7-Zellen. Histologisch zeigten sich bei Mäusen, die mit anti-MIF-mAK behandelt wurden, eine deutlich stärkere Infiltration an CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sowie auch eine erhöhte Zahl an apoptotischen Tumorzellen (1).

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass MIF eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen spielt und auch bei der T-Zell-Antwort gegen Tumoren regulierend einwirkt.

1.3.5 MIF im angeborenen Immunsystem

Monozyten und Makrophagen enthalten große Mengen an bereits gebildetem MIF, die auf Stimulation mit LPS, gram-positiven Exotoxinen (z.B. dem Toxic Shock Syndrome Toxin-1), proinflammatorischen Zytokinen ($\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$) (22) und Malariapigment (37) ausgeschüttet werden. MIF wirkt im parakrinen und autokrinen Sinne und fördert die Zellaktivierung sowie die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Außerdem hat es eine verstärkte Phagozytose von Makrophagen zur Folge (107) sowie eine verbesserte Abtötung intrazellulärer Pathogene, wie der Leishmania (54), und eine Akkumulation von Makrophagen bei Typ-IV-Immunreaktionen nach Coombs (16, 35). Eine Ausschüttung von MIF aus Zellen der Zirbeldrüse sowie aus vielen anderen Epithelien des Körpers wurde in Ratten sechs Stunden nach einer LPS-Injektion nachgewiesen. MIF, zusätzlich zu LPS verabreicht, erhöht die Letalität des LPS-induzierten Schocks, während eine Behandlung mit anti-MIF-mAK bis zu acht Stunden nach der Infektion die Letalität verringert (12) und die $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel auf bis zu 50% absenkt (23). Die wichtige Rolle von MIF beim Endotoxin-Schock wurde auch in Knockout-Mäusen für MIF gezeigt (17). MIF-Knockout-Mäuse waren gegen die tödliche Wirkung einer hohen Dosis von LPS resistent und zeigten eine verminderte Produktion von $\text{TNF}\alpha$, während die Produktion von IL-6 und IL-12 in normalen Bereichen blieb (17). Diese Ergebnisse unterstützend, konnte eine Studie von Beishuizen et al. (9) eine Korrelation zwischen erhöhten MIF-Werten und einer schlechteren Prognose von Sepsis-Patienten demonstrieren. Studien von Calandra et al. (23) haben gezeigt, dass auch $\text{TNF}\alpha$ -Knockout-Mäuse mit Hilfe von anti-MIF-mAK vor einer tödlichen Sepsis geschützt sind, und dass folglich ein anderer Mechanismus als die $\text{TNF}\alpha$ -Modulation für den Effekt des Antikörpers verantwortlich sein muss. Die Neutralisierung von MIF zeigt vergleichbar protektive Effekte auch bei durch Exotoxin induzierten Schockerkrankungen von grampositiven Bakterien, zum Beispiel dem durch Staphylokokken induzierten "Toxic Shock Syndrome" (24). MIF Knockout-

Mäuse waren geschützt gegen die Injektion von letalen Dosen des Staphylokokken-Enterotoxins B (23).

Auch Glukokortikoide wirken als Sekretionsstimulus für MIF in Makrophagen. Die Sekretion folgt einer glockenförmigen, dosisabhängigen Kurve. MIF wirkt antagonistisch auf die Effekte von Glukokortikoiden und führt zu einer Zytokinproduktion in Makrophagen ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8) und T-Zellen (IL-2 und $\text{IFN-}\gamma$) (Abb. 4; 5, 19, 21). Die beiden Mediatoren haben ein fein reguliertes Gleichgewicht, das die Zytokin-Produktion und Entzündungsreaktion entscheidend beeinflusst.

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass MIF ein wichtiger Regulator in der Signalkaskade des angeborenen Immunsystems ist.

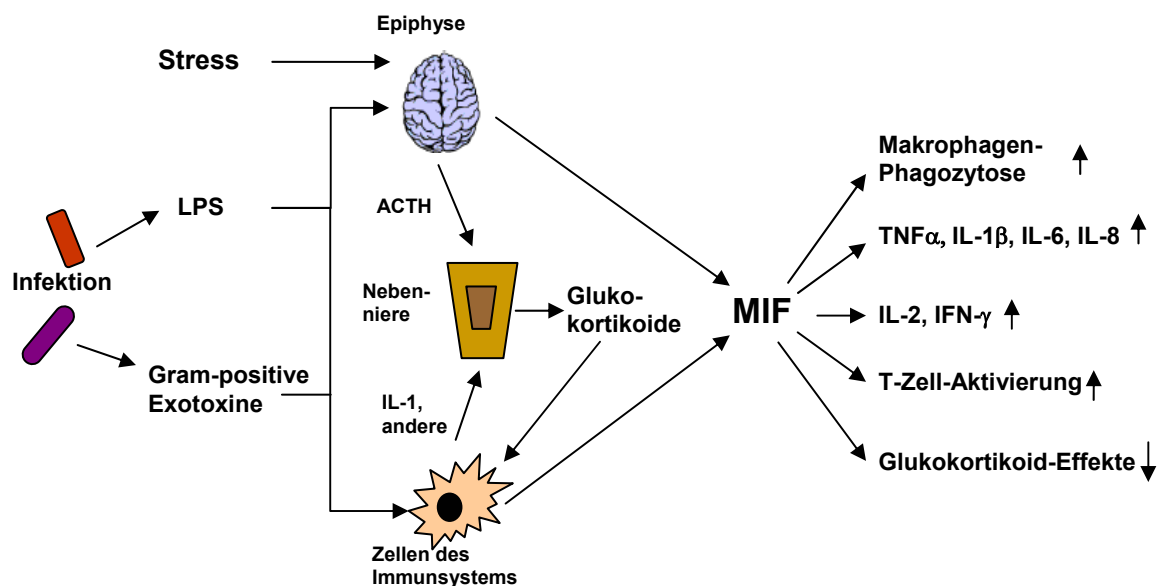


Abb. 4: Glukokortikoide und MIF

Glukokortikoide und MIF stehen in einem streng kontrollierten Gleichgewicht. MIF wird durch Glukokortikoid-Stimulation ausgeschüttet, wirkt dann aber antagonistisch auf die Effekte von Glukokortikoiden. Das Gleichgewicht der beiden Gegenspieler scheint in Autoimmunerkrankungen durch Überexpression von MIF und proinflammatorischen Zytokinen gestört zu sein.

1.3.6 Molekulare Mechanismen der MIF-Wirkungen

Genauere Untersuchungen zu Mechanismen der multiplen immunologischen und nicht-immunologischen Effekte von MIF in Krankheitsmodellen führen auf die zelluläre Ebene. Das Protein agiert als inflammatorisches Chemokin, neuroendokrines Hormon und als Enzym (Kapitel 1.3.3). Betrachtet man die verschiedenartigen Wirkungen von MIF und seine konservierte Gen-Struktur, kann man davon ausgehen, dass MIF ein in der Evolution stark konserviertes Protein ist, das über viele Signalwege wirkt.

Mehrere Studien lassen auf Wechselwirkungen von MIF mit Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen schließen (5, 10, 12, 21, 47, 136). Bis heute wurde aber nur ein Rezeptor für MIF beschrieben. CD74, ein Typ II-Transmembranprotein, wurde als extrazelluläre Bindungsstelle für MIF identifiziert. Andere Rezeptoren, welche die diversen Effekte von MIF vermitteln könnten, wurden noch nicht gefunden. Eine nicht-Rezeptor-vermittelte Endozytose kann einen Teil der MIF-Wirkungen erklären (68).

MIF wirkt unmittelbar proinflammatorisch durch die Steigerung der Zytokin-Expression von $\text{TNF}\alpha$ (22, 23), $\text{IL-1}\beta$, IL-6 (22), IL-8 (10), $\text{IFN-}\gamma$ (1, 5) und die Induktion des Cyclooxygenase-II-Signalwegs (95) sowie der MMP (106). Außerdem wirkt MIF indirekt fördernd auf die Entzündung durch die Gegenregulation der entzündungshemmenden Wirkungen von Glukokortikoiden (5, 19, 21; Abb. 4). In diesem streng regulierten Gleichgewicht zwischen den Mediatoren bewirken Glukokortikoide eine Ausschüttung von MIF, während MIF dann der Glukokortikoid-induzierten Sekretionshemmung von inflammatorischen Zytokinen in Makrophagen, synovialen Fibroblasten und T-Zellen entgegenwirkt und dazu führt, dass $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 (22, 79), $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 (5) erhöht sind.

Betrachtet man die Signalwege in der Zelle, findet man bei Fibroblasten nach MIF-Stimulation über den CD74 Rezeptor (81) eine erhöhte Aktivität der p44/p42-extrazellulär-Signal-regulierten-Kinasen-(ERK)-Subfamilie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Die Signalkaskade der ERK/MAPK resultiert unter anderem in der Phosphorylierung und Aktivierung einer Reihe von zytoplasmatischen Proteinen, wie zum Beispiel *c-myc* und der Phospholipase A_2 (cPLA₂). cPLA₂ ist ein wichtiger Mediator von Entzündungsreaktionen (46), und ihr Produkt, die Arachidonsäure, ist der Vorläufer von Leukotrienen und Prostaglandinen. Die Arachidonsäure aktiviert unter

anderem die c-Jun-N-terminale Kinase, die für die Translation der mRNA des TNF α benötigt wird. Da die cPLA₂ auch ein Zielprotein der Glukokortikoide ist, kann die Aktivierung durch MIF ein Mechanismus sein, mittels dessen das Chemokin den Glukokortikoiden entgegenwirkt (95).

Ein anderer Mechanismus, durch den MIF die Entzündungsreaktion beeinflussen und den Glukokortikoiden entgegenwirken könnte, ist der Effekt auf NF- κ B. NF- κ B ist ein wichtiger Regulator der Genexpression von inflammatorischen Zytokinen (7) und der Expression von Oberflächenmolekülen auf Endothelien (129). Mehrere Studien unterstützen die Annahme, dass Glukokortikoide über die Induktion der I κ B-Synthese (2) und die Inhibition einer Untereinheit von NF- κ B der Wirkung von NF- κ B entgegenstehen. Daun et al. (34) konnten beweisen, dass MIF in humanen mononukleären Zellen die Induktion der I κ B-Synthese durch Glukokortikoide hemmt und dadurch zu einem Anstieg von NF- κ B führt. Die Gruppe um T. Calandra (114) zeigte, dass die Wirkung von MIF sowohl auf die NF- κ B-Aktivität als auch auf die Produktion von TNF α über den Toll-Rezeptor 4 (TLR4) vermittelt ist, und zwar über eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors PU.1, der für die optimale Expression des TLR4-Gens in myeloiden Zellen notwendig ist. MIF-defiziente Mäuse haben eine verminderte TLR4-Expression, was die Hyposensitivität gegenüber LPS erklärt (17).

Weitere Daten (67) lassen vermuten, dass MIF durch eine Interaktion mit dem Janus-Kinase-bindenden Protein 1 (Jab-1) auf die Transkriptionsaktivität des Aktivatorproteins 1 (AP-1) wirkt. Die Aufnahme von MIF in die Zelle geschieht in diesem Fall durch eine nicht-Rezeptor-vermittelte Endozytose (68). AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor für IL-1, IL-2 und IFN- γ , der DNA als Heterotrimer zusammen mit den FOS- und Jun-Onkoproteinen bindet. Jab-1 stabilisiert diesen Trimerkomplex. Über die Interaktion von MIF mit Jab-1 kommt es zur Destabilisierung des Komplexes. Da AP-1 als wichtiger Regulator von proinflammatorischen Genen gilt, widersprechen diese Daten aber auf den ersten Blick der proinflammatorischen Wirkung von MIF. Jab-1 bindet außerdem p27^{Kip1} und fördert die Degradierung dieses Proteins, das in seiner Funktion inhibierend auf den Zellteilungszyklus wirkt. Vermehrt vorhandenes MIF hemmt folglich die wachstumsfördernden Wirkungen von Jab-1 auf Fibroblasten (67). Diese Ergebnisse widersprechen den wachstumsfördernden Wirkungen von MIF, die in der Literatur beschrieben sind (95). Jedoch können diese Erkenntnisse auch die

Annahme unterstützen, dass MIF in unterschiedlicher Konzentration unterschiedliche Funktionen ausübt, wie dies in diversen Publikationen vorgeschlagen wird (13, 121).

Die Resistenz gegenüber Glukokortikoiden in der Therapie von Autoimmunerkrankungen beim Menschen wird zunehmend mit einer erhöhten AP-1- und NF- κ B-Aktivität assoziiert (6). Dies könnte MIF eine entscheidende Rolle zuspielden, was die Wirksamkeit von endogenen und therapeutisch verabreichten Glukokortikoiden und die damit verbundenen klinischen Implikationen anbelangt.

MMP sind wichtige Entzündungsmediatoren in der Pathogenese der MS (41, 63, 83; Kapitel 1.1.2.4). Glukokortikoide sind in der Lage, die Expression von MMP zu reduzieren. Für MIF wurde hingegen gezeigt, dass es die mRNA-Produktion von MMP-1 und MMP-3 in Synovialzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis erhöht (106). Dies wäre ein weiterer möglicher Mechanismus, über den MIF den Glukokortikoiden auch in der Pathogenese der MS entgegenwirkt.

Außerdem wurde gezeigt, dass eine durch Adhäsion induzierte Sekretion von MIF in Fibroblasten zu einer Integrin-vermittelten Aktivierung von MAPK und einer Expression von Cyclin D1 führt, welche im weiteren Verlauf der Signalkaskade eine Phosphorylierung des Retinoblastoma-Tumorsuppressor-Proteins zur Folge hat. MIF spielt also auch eine wichtige Rolle in der malignen Transformation von Zellen (84).

Die Apoptose-hemmenden und Zellwachstum-fördernden Eigenschaften von MIF können außerdem zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beitragen. Während einer Entzündungsreaktion wird die Proliferation von Immunzellen durch Apoptose gegenreguliert. Ein beeinträchtigter Apoptosemechanismus kann zu einer verlängerten Entzündungsreaktion führen (98). Der Arachidonsäure-Metabolismus und die Expression von COX-2 hemmen die p53-Akkumulation und damit die Apoptose von Makrophagen (135). MIF induziert cPLA2 (95) und erhöht die Expression von COX-2 (94). Dies kann die Beobachtung erklären, dass MIF über einen autokrinen Mechanismus *in vivo* (94) und *in vitro* (51) zu einer verminderten Akkumulation des Tumorsuppressor-Gens p53 und damit zu einer verlängerten Lebensspanne von Makrophagen führt (94, 101). Grundsätzlich sind aber auch andere Signalwege, durch die MIF auf p53 Einfluss nimmt, denkbar.

Des Weiteren verhindert MIF über eine verzögerte Spaltung der Apoptose-fördernden Proteine Bid und Bax aus dem Bcl-2-Signalweg die Freisetzung von Cytochrom C und

Smac aus den Mitochondrien und inhibiert dadurch einen weiteren Apoptosemechanismus. MIF kann aber auch Apoptose fördern. Das geschieht über die Förderung der NO-Freisetzung und den NO-vermittelten Effekt auf den p53-Signalweg. All diese Erkenntnisse lassen multiple Rückkopplungsmechanismen und einen fein gesteuerten Einfluss von MIF auf die Apoptose annehmen.

Insgesamt gibt es sehr viele Signalwege, über die MIF zu wirken scheint. Außerdem spielen dosisabhängige Effekte eine wichtige Rolle. Die bis heute publizierten Erkenntnisse erlauben noch kein Gesamtbild von der Signaltransduktion des Chemokins. Abbildung 5 stellt den Versuch einer Zusammenfassung dar.

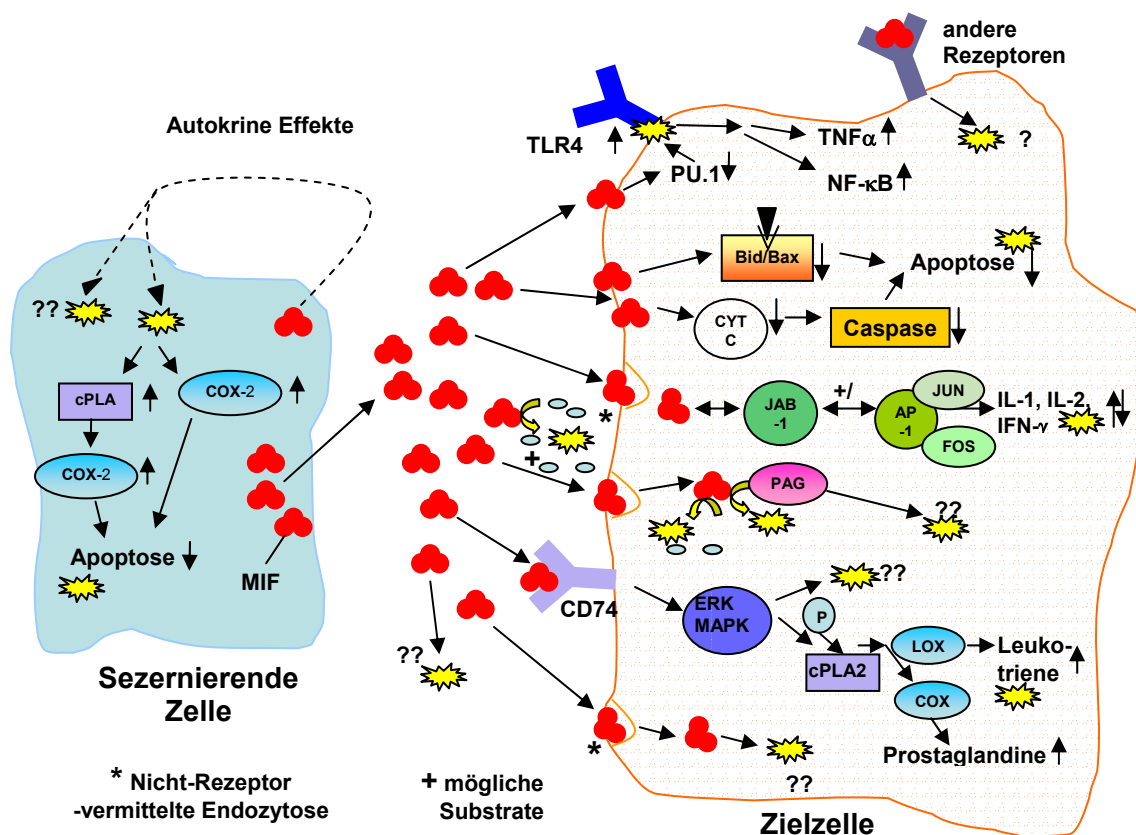


Abb. 5: Mögliche Signaltransduktionswege von MIF

Verschiedene Signaltransduktionswege wurden für MIF vorgeschlagen. Das Protein agiert in Form eines autokrinen Signals auf die sezernierende Zelle. Auf die Zielzelle wirkt es über einen Rezeptor-vermittelten Weg, über eine enzymatische Katalyse von PAG-Protein und anderen Substraten sowie über Signalwege, die Jab-1 und ERK/MAPK vermittelt sind. Abkürzungen: +/-: Dosis-abhängiger Effekt; ⇔: Proteininteraktionen; ⇨: Signaltransduktion; ?: unbekannter Mechanismus; ⚡: enzymatische Reaktion; gelber Stern: Effekt.

1.3.7 MIF in Krankheitsmodellen

All die aufgeführten Erkenntnisse legen die Annahme nahe, dass MIF in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielt und eventuell als Angriffspunkt für eine Therapie in Frage kommt.

In ersten Untersuchungen zu spezifischen Erkrankungen wurden erhöhte MIF-Konzentration im Serum von Patienten mit Psoriasis (120), Glomerulonephritis (49), Iridozyklitis (65) und rheumatoider Arthritis (108) gefunden. Des Weiteren konnte eine erhöhte MIF-Konzentration im Serum und Liquor von Patienten mit Neuro-Behçets-Erkrankung und Multipler Sklerose beschrieben werden (102).

Die rheumatoide Arthritis und die Glomerulonephritis wurden eingehender untersucht. Für die rheumatoide Arthritis wurde eine Behandlung mit anti-MIF-mAK in einem Mausmodell der Kollagen-TypII-induzierten Arthritis und einem Rattenmodell der Adjuvans-induzierten Arthritis versucht (79, 92). Beide Arbeiten konnten zeigen, dass sich, bei einer Injektion des Antikörpers intraperitoneal am Tag der Immunisierung und im Drei-Tages-Abstand danach, sowohl der Ausbruch der Erkrankung verzögert als auch die klinische Ausprägung abgeschwächt wird. Außerdem wurden reduzierte Konzentrationen von IgG2-Antikörpern und eine verminderte Infiltration von Entzündungszellen in die Synovia festgestellt. Eine Behandlung mit Glukokortikoiden verhinderte die Erkrankung. Die gleichzeitige Administration von MIF zusammen mit Glukokortikoiden hob den protektiven Effekt der Glukokortikoide auf (79, 92). Auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde eine erhöhte MIF-Konzentration gefunden (108). Die MIF-Sekretion der kultivierten Synovialzellen wurde durch Glukokortikoide in Form einer Dosis-Wirkungsbeziehung gehemmt (108). Außerdem korrelierte die Sekretion von MIF in vivo stark mit der Krankheitsaktivität, die anhand des CRP-Spiegels im Blut bestimmt wurde. Umgekehrt wurde eine Besserung im Erkrankungsverlauf von einer Reduktion des MIF-Spiegels im Blut begleitet (97).

Die frühe Erkrankungsphase der Glomerulonephritis ist durch eine Ablagerung von Antikörpern und Komplementfragmenten in die Glomeruli gekennzeichnet. Die weitere Progression der Erkrankung hängt aber entscheidend von der Akkumulation von Makrophagen und T-Zellen ab (76). In einem Rattenmodell der Glomerulonephritis

konnte ein Anstieg von MIF in den Glomerulus- und Tubuluszellen der Nephrone während der Erkrankungsphase verzeichnet werden (77). Eine Vorbehandlung der Tiere mit anti-MIF-mAK vor Induktion der Erkrankung verhinderte den Abfall der Nierenfunktion und verminderte die typische histopathologische Veränderung der Nephrone in Form von Halbmonden sowie die Infiltration und Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die glomeruläre und interstitielle Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und VCAM-1) reduziert und die Hochregulierung von IL-1 und NO-Synthase in den infiltrierenden Makrophagen verhindert wurde (76).

Alle diese Erkenntnisse zu MIF in diversen Autoimmunerkrankungen lassen eine Rolle auch in der Pathogenese der MS vermuten und legen deshalb Studien zu einer Immuntherapie mit anti-MIF-mAK im EAE-Modell nahe.

In der folgenden Arbeit wurden zum ersten Mal Experimente durchgeführt, die die Rolle des MIF in der Pathogenese von EAE beleuchten und einen monoklonalen Antikörper gegen MIF als mögliche Behandlung im Mausmodell testen.

2 Methoden

2.1 Tiere, Antigene und Immunisierungen

Weibliche SJL/J- und C57BL/6J-Mäuse werden im Alter von sechs bis zehn Wochen subkutan im Bereich der Flanken immunisiert. Als Antigene werden PLP-Peptid AA139-151 (PLPp139-151, HSLGKWLGHDPKF) und MOG-Peptid AA35-55 (MOGp35-55, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) verwendet. Bei dem Adjuvans handelt es sich um CFA, das aus dem inkompletten Freund-Adjuvans durch Mischung mit *M. tuberculosis* H 37 Ra in einer Konzentration von 5mg/ml hergestellt wird. Die Antigene werden mit dem Adjuvans vermischt, so dass eine Emulsion von 1mg/ml entsteht. 50µl dieser Mischung werden pro Maus injiziert. Zusätzlich bekommen die Mäuse PT (200ng) in 0,5ml NaCl an Tag 0 und 24 Stunden später intraperitoneal appliziert. Der neutralisierende anti-MIF-monoklonale Antikörper (anti-MIF-mAK) (Klon XIV.15.5, IgG1 Isotyp) und die Isotyp-Kontrolle HB-49 (Hybridom, 5D4-11, ATCC, Manassas, VA) werden, wie von Chesney et al. (27) beschrieben, zubereitet. Die Antikörper werden intraperitoneal mit 0,5mg pro Maus in 0,5ml physiologischer Kochsalzlösung injiziert.

2.2 Klinische Evaluation des Krankheitsverlaufs

Die Tiere werden täglich über mehr als 30 Tage nach der Injektion des Antigens beobachtet. Der Krankheitsgrad wird von einem geblindeten Pathologen nach der in Kapitel 1.2 beschriebenen Skala beurteilt. Ab Stadium zwei der EAE wird Nahrung auf den Boden des Käfigs gelegt, um eine Verfälschung der Krankheitsentwicklung durch unzureichende Ernährung zu verhindern. Statistische Werte wurden errechnet, in dem alle Mäuse einer Gruppe mit Hilfe des t-Tests zu verschiedenen Zeitpunkten im Laufe eines Krankheitsschubs mit den Mäusen der anderen Gruppe verglichen wurden.

2.3 Zytokin-Messungen mit Hilfe des ELISPOT

2.3.1 Die Durchführung des ELISPOT

Die ELISPOT-Platten werden mit IFN- γ - (Konzentration von 4 μ g/ml), IL-2- (Konzentration 2 μ g/ml), IL-4- (Konzentration 4 μ g/ml) oder IL-5- (Konzentration 5 μ g/ml) spezifischen „Capture-Antikörpern“ unter sterilen Bedingungen beschichtet und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden die Platten mit 1% BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um die freien Bindungsstellen zwischen den Antikörpern abzusättigen (Verminderung der unspezifischen Antwort, sogenannter “Background”) und dann viermal mit PBS gewaschen. Des Weiteren werden ein spezifisches Antigen und anti-CD3-Antikörper (positive Kontrolle) in je einem Röhrchen (Falcon, Fisher Scientific) mit HL-1 gemischt, um die gewünschte Konzentration von 200 μ g/ml, respektive 2 μ g/ml, zu erhalten. Außerdem wird eine entsprechende Menge pures Medium zurückbehalten (negative Kontrolle). Medium, die Antigen- und die anti-CD3-Emulsion werden mit jeweils 100 μ l pro Nöpfchen in Duplikaten oder Triplikaten auf die Platten pipettiert.

Danach werden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, und es wird das benötigte Organ (Milz, Lymphknoten oder Rückenmark) entnommen, um daraus mit der Rückseite einer 10ml-Spritze in einer mit 10ml DMEM gefüllten Petrischale eine Zellsuspension zu erstellen. Diese wird dann über ein Zellsieb in 50ml-Röhrchen transferiert, um anschließend in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl zu bestimmen. Dazu werden 90 μ l Acridinorange mit 10 μ l Einzelzell-Suspension gemischt und anschließend unter UV-Licht im Mikroskop ausgezählt. Zellen mit Nukleus zeichnen sich in dieser Färbung grün ab, während tote Zellen mit desintegriertem Nukleus rot erscheinen. Die Anzahl an lebenden Zellen wird zur Berechnung der Menge des kompletten HL-1-Mediums verwendet, die man nach Abzentrifugation und anschließender Resuspension benötigt, um in jedem Röhrchen eine Zell-Konzentration von 10×10^6 Lymphozyten pro ml zu erhalten. Zuletzt werden 100 μ l Zellsuspension pro Nöpfchen zu den oben erwähnten 100 μ l Medium (mit und ohne Antigen) pipettiert und alles bei 37°C für 24 (IFN- γ , IL-2, IL-3) beziehungsweise 48 (IL-4, IL-5) Stunden inkubiert.

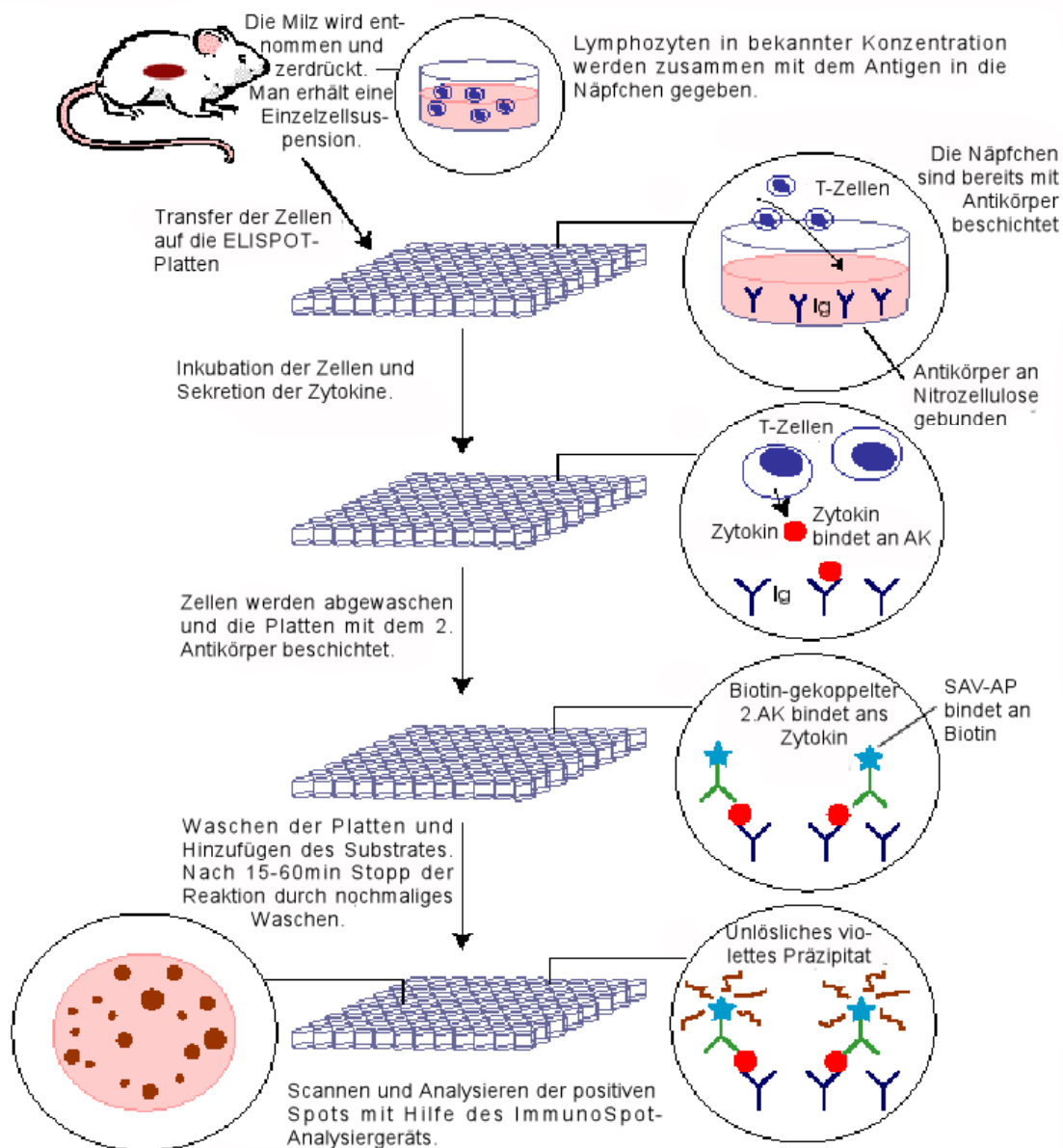


Abb. 6: Übersicht über die Funktionsweise eines Zytokin-ELISPOT-Assays

Bis zum Ende der Inkubation wird strengstens auf Sterilität geachtet. Mit jeweils viermaligem Abwaschen der Zellen mit PBS und PBS/Tween wird nach der entsprechenden Inkubationszeit der zweite Teil des Experiments begonnen. Die Platten werden mit einem in PBS/Tween/1%BSA gelösten zweiten Antikörper (IFN- γ (Konzentration 2 μ g/ml), IL-2 (2 μ g/ml), IL-4 (2 μ g/ml), IL-5 (4 μ g/ml)), der ebenfalls an

die jetzt fixierten Zytokine bindet und mit Biotin gekoppelt ist, beschichtet und in einer angefeuchteten Box über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Morgen werden die Platten viermal mit PBS/Tween gewaschen und mit 100µl pro Näpfchen der Streptavidin-Alkalischen-Phosphatase in einer Konzentration von 1:1000, gemischt in PBS/Tween/1%BSA, zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wird viermal nur mit PBS gewaschen und für die Farbreaktion 200µl pro Näpfchen NBT/BCIP-Substrat zu gegeben. Dabei wird das 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP, 33µg) durch die an den zweiten Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase und die Reaktion mit dem Farbstoff NBT (Nitro Blue Tetrazolium, 66µg) in ein violettes Präzipitat umgesetzt. Nach etwa 15 bis 60Min wird die Reaktion beendet, indem die Platten mit destilliertem Wasser abgewaschen und anschließend an der Luft getrocknet werden. Eine Übersicht über die einzelnen Schritte gibt Abb. 6.

2.3.2 Computer-assistierte ELISPOT-Analyse

Die Zytokin-Produktion im Umfeld einer Zelle wird auf der Membran gebunden und erscheint in der entsprechenden Vertiefung als Punkt (siehe Abb. 7). Dieser Punkt repräsentiert eine Zelle, die Antigen-spezifisch das entsprechende Zytokin produziert. Die Größe des Punktes korreliert mit der Zytokinmenge pro Zelle (48).

Zur Auswertung der Platten wird der ImmunoSpotTM Image Analyzer von Cellular Technologies, Cleveland, OH, USA benutzt. Dieses Gerät ist in der Lage, die entwickelten Platten zu scannen und digital weiterzuverarbeiten. Nachdem die Bilder gescannt sind, werden die Spotzahlen untersucht und positive wie negative Kontrollen mit den Antigen-stimulierten Näpfchen verglichen. Spezielle Funktionen zur Trennung von Spots, die sich leicht berühren oder gar überlappen sowie zur Filterung unspezifischer Artefakte durch Vorgabe der spezifischen Spotgröße und einer Kreisformanalyse (circularity analysis) werden zusätzlich angewandt. Alle Spots, die innerhalb der gesetzten Grenzen liegen, werden markiert und gezählt. Zusätzlich werden so genannte „Spot-Size-Histogramme“ (Histogramme, welche die Größenverteilung der Spots in den einzelnen Näpfchen aufzeigen) angefertigt, die Aufschluss darüber geben, wie groß die Zytokin-Produktion pro Zelle ist (61). Der Mittelwert der Spotzahl aus den

Medium-Näpfchen wird berechnet und von der Zahl der Zytokin-Spots in den mit Antigen versetzten Näpfchen abgezogen. Die Spot-Zahl der nicht immunisierten bzw. der Kontroll-Mäuse (irrelevantes Antigen) sind vergleichbar mit denen der Medium-Kontrollen.

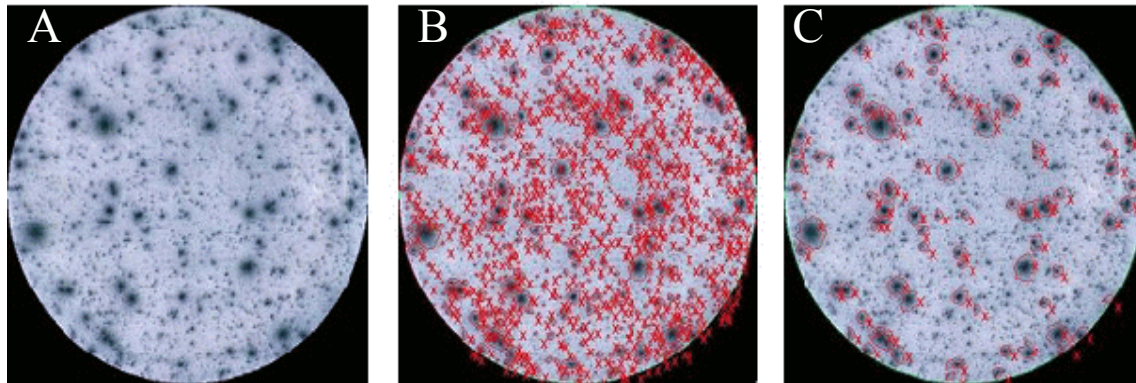


Abb. 7: Vergleich einer Näpfchen-Analyse mit und ohne spezifische Filter

In Abb. 7A ist ein schwieriger auszuwertendes Näpfchen eines ELISPOTS zu sehen. Die dicken Punkte entsprechen Zytokin-produzierenden Zellen, die kleinen sind auf Artefakte zurückzuführen. Würde man die Maschine die Punkte einfach zählen lassen, indem man nur den Hintergrund subtrahiert, käme ein Ergebnis wie in Abb. 7B zustande. Wendet man zusätzliche Kriterien an, wie die Kreisformanalyse und die Bestimmung der Spot-Größe, erhält man eine für das Näpfchen repräsentative Zahl (Abb. 7C).

2.4 ELISA

Der ELISA ist eine seit langem gebräuchliche Methode zur Bestimmung von Zytokinen. Da der ELISPOT für einige Zytokine noch nicht etabliert werden konnte, ist man hier auf den ELISA angewiesen. Im Falle des ELISAs wird das Zytokin zwischen einem „Coating“- und einem „Detection“-Antikörper eingefangen. Es kann aber nicht die Produktion einer einzelnen Zelle bestimmt werden, wie im ELISPOT, sondern nur die Produktion aller Zellen im Überstand.

Es wird 1ml des Antigens, auf das die T-Zell-Antwort bestimmt werden soll, in einem serumfreien Medium (HL-1) verdünnt und auf eine 24-Näpfchen-Platte pipettiert, wobei die optimale Konzentration des Antigens durch eine Titrationsreihe bestimmt wird. Als positive Kontrolle wird anti-CD3-Antikörper, der eine unspezifische Stimulierung aller T-Zellen bewirkt, verwendet. Alternativ kann, bei einer CFA-Immunisierung, PPD, als im CFA enthaltenes Antigen, benutzt werden. Medium ohne

Antigen dient als negative Kontrolle. Die Platten werden dann im Kühlschrank gelagert, bis die entsprechende Zellsuspension vorbereitet ist. Die Versuchsmäuse werden durch zervikale Dislokation getötet, um unmittelbar danach die Milzen unter sterilen Bedingungen zu entnehmen. Jede Milz wird einzeln mit Hilfe eines Spritzenkolbens in DMEM zerkleinert, um dann grobe Partikel, unter anderem die Milzkapsel, mit einem Zellsieb abzufiltern. Die Anzahl der Zellen in der Zellsuspension wird in einer Verdünnung von 1:10 mit Acridinorange in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Fluoreszenz-Mikroskop gezählt. Die Zellen werden abzentrifugiert, resuspendiert und dann mit HL-1 in einer Konzentration von 10×10^6 Zellen per Milliliter verdünnt. Von dieser Zellsuspension wird 1ml auf die Platten pipettiert, und die Platten werden dann in einem Inkubator bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert. Die Restimulationszeit beträgt vier Tage. Nach der Inkubationszeit nimmt man den Überstand in den Nöpfchen ab. Eine 96-Nöpfchen-Mikrotiter-Platte wird mit einem "Coating"-Antikörper, verdünnt in PBS/Tween/Gelatine, beschichtet. Die optimale Konzentration des Antikörpers in der Verdünnung wird zuvor in Titrationsreihen bestimmt. Die Platten werden über Nacht in einem feuchten, abgeschlossenen Behälter im Kühlschrank inkubiert. Der überschüssige Antikörper wird am nächsten Morgen mit PBS/Tween durch viermaliges Waschen entfernt. Um eine unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers und des Antigens zu verhindern, wird die Platte für eine Stunde mit PBS/Tween/Gelatine geblockt und anschließend wieder mit PBS/Tween viermal gewaschen. Dann werden 100µl des Überstandes von positiver und negativer Kontrolle und der Experimentalgruppe entsprechend der Experimentplanung auf die Platten pipettiert und über Nacht im Kühlschrank in einem feuchten Behälter inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit (abhängig vom zu bestimmenden Zytokin) wäscht man die Platten viermal mit PBS/Tween, trägt dann den zweiten Antikörper, verdünnt in PBS/Tween/Gelatine, auf und inkubiert über Nacht im Kühlschrank in einem befeuchteten Behälter. Am nächsten Tag werden die Platten viermal mit PBS/Tween gewaschen und dann über zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 100µl Streptavidin-Alkalische-Phosphatase in einer Verdünnung von 1:1000 mit PBS/Tween/Gelatine inkubiert. Anschließend werden die Platten mit PBS/Tween viermal gewaschen. Zur Entwicklung werden 200µl Substrat hinzugegeben, das aus PNPP (p-Nitrophenyl phosphate disodium salt X 6H₂O) verdünnt in PNPP-Puffer (0,5mg in 30ml) besteht.

Nach drei bis vier Stunden ist eine klare Gelbfärbung in den Nöpfchen zu erkennen. Die relative Extinktion wird mit Hilfe eines ELISA-Analyse-Geräts bestimmt und ausgewertet.

2.5 Adoptiver Transfer von PLPp139-151-spezifischen T-Zellen

Für den AT werden die Milzen von PLPp139-151:CFA-immunisierten und eventuell zusätzlich mit Antikörpern behandelten Mäusen zwei bis drei Wochen nach Immunisierung entnommen und daraus, wie für den ELISPOT beschrieben, eine Zellsuspension hergestellt. Aus der Suspension wird die Zellzahl bestimmt, um anschließend mit DMEM auf eine Konzentration von 20×10^6 /ml zu verdünnen. Dann werden die Zellen für drei Tage mit PLPp139-151 in einer optimal stimulierenden Konzentration (20µg/ml) inkubiert. Währenddessen wird ein IL-2-Zytokin-ELISPOT zur Bestimmung der Zahl der aktivierten PLPp139-151-reaktiven T-Zellen durchgeführt. Nach drei Tagen wird die Zellsuspension dreimal gewaschen, um Überreste des Antigens zu entfernen. Die Zahl der PLPp139-151 reaktiven T-Zellen wird berechnet anhand der IL-2-produzierenden Zellen im ELISPOT und der Gesamtzahl der Zellen aus der Kultur. Anschließend wird eine entsprechende Menge an HL-1 zugesetzt, so dass die Menge der PLPp139-151-reaktiven T-Zellen pro Milliliter in der Zellsuspension von Experimental- und Kontrollgruppe gleich ist. Durch entsprechende Verdünnung können Titrationsreihen erstellt werden. Die Zellsuspension wird dann gemäß dem Versuchsprotokoll intraperitoneal den Empfängermäusen injiziert. Die Empfänger werden täglich auf den Beginn und den Verlauf der Krankheit beobachtet und nach der in Kapitel 1.2 beschriebenen Skala bewertet.

2.6 Durchflusszytometrie (FACS)

2.6.1 Vorbereitung der Zellen

Für die Durchflusszytometrie wurde Mäusen nach entsprechender Immunisierung und Behandlung das Rückenmark entnommen und anschließend, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, die Zellmasse zu einer Zellsuspension verarbeitet.

Um die Messgenauigkeit zu erhöhen, können die mononukleären Zellen des Zellhomogenats durch eine Ficoll-Dichtezentrifugation angereichert werden. Anschließend werden die Zellen in DMEM gezählt und mit einer bestimmte Menge an Coulter PBS + 2% FCS (fetal calf serum, fetales Kälberserum) versetzt, um genau eine Konzentration von 10×10^6 Zellen/ml zu erhalten.

Für den Rest des Experimentes wird darauf geachtet, dass die Zellen auf Eis lagern. 100µl der Suspension (also 1×10^6 Zellen) werden in jedes Näpfchen einer Zellkulturplatte gegeben. Positive (für Isotyp und Antigen) und negative Kontrolle (Medium) werden ebenfalls aufpipettiert. Dann werden die Platten bei 1200rpm für 5Min zentrifugiert, die Überstände abgeworfen, die Pellets resuspendiert und mit 100µl/Näpfchen Mausserum (10%) für 20Min geblockt. Danach werden die Zellsuspensionen mit 5µg anti-CD4- oder anti-CD11b-Antikörper, die entweder an FITC (Fluorisoithiocyanat) oder PE (Phycoerythrin) gekoppelt sind, 45Min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wird viermal mit Coulter-PBS gewaschen, zentrifugiert (1200rpm, 5Min), der Überstand verworfen und die Pellets resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation werden die Zellen in 150µl/Näpfchen „Lysing buffer“ aufgenommen und für 60sek inkubiert. Dieser Puffer besteht aus Coulter-„Lysing Reagenz“ gemischt mit Coulter-PBS (1:25) und ist in der Lage, die bei der Detektion störenden roten Blutkörperchen zu lysieren. Sofort danach wird die Reaktion durch Zugabe von 50µl/Näpfchen Fixans gestoppt.

2.6.2 FACS-Analyse

Für die Durchführung am Gerät werden die fixierten Zellen aus den 96-Näpfchen-Platten in spezielle Reagenzgläser auf Eis transferiert und mit 500-1000µl Coulter-PBS verdünnt. Anschließend werden die einzelnen Proben mit einem Becton Dickinson FACS Scan analysiert. Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet (Abb. 8).

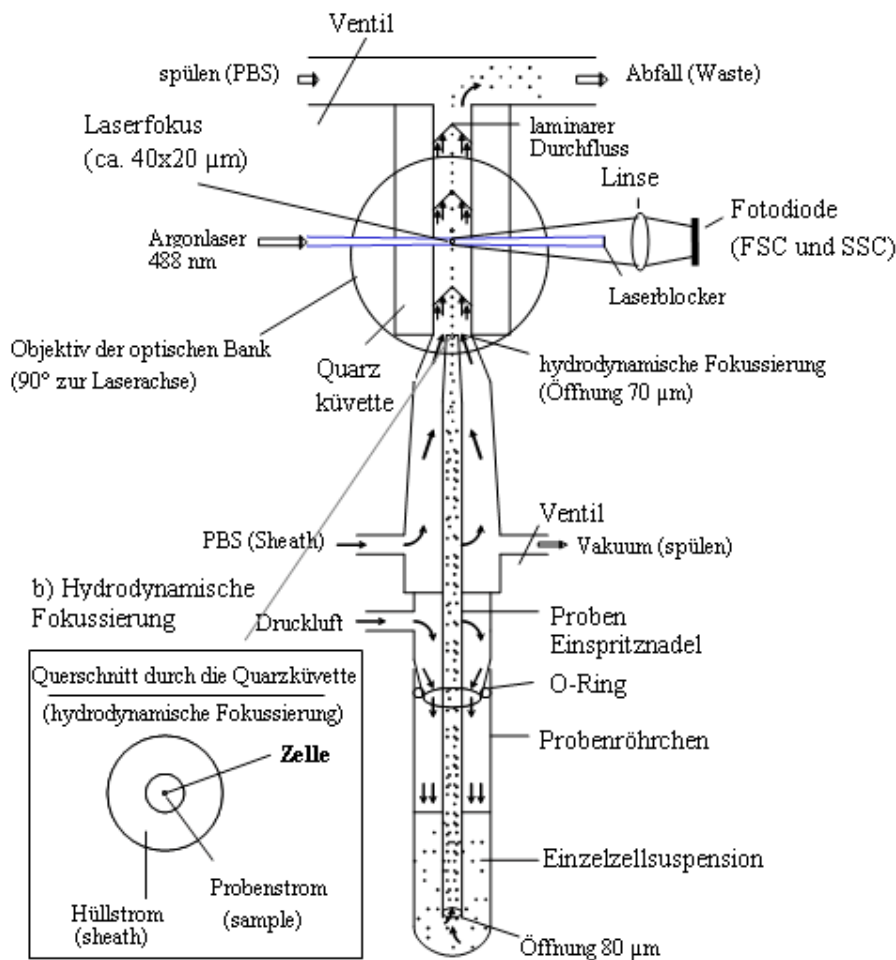


Abb. 8 Prinzip eines analytischen Durchflusszytometers

Bei Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Körnigkeit des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen. So wird also von dem Gerät erkannt, wie viel des entsprechenden Markers eine einzelne Zelle exprimiert. Auf den jeweiligen Histogrammen oder „Dotplots“ kann man dann das repräsentative Ergebnis einer großen Zahl getesteter Zellen pro Reagenzglas begutachten.

2.7 H&E-Färbung

Nachdem die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet wurden, werden Gehirn und Rückenmark entnommen und in 10% Formalin eingelegt. Die Proben werden dann in Paraffin eingebettet, um anschließend 5µm-Schnitte des Gewebes anzufertigen. Auf die Schnitte wird Eosin getropft, so dass das Gewebe vollständig bedeckt ist. Nach einer Inkubationszeit von 20Min bei Raumtemperatur wird mit doppelt-distilliertem Wasser (ddH₂O) abgewaschen und dann für eine Minute mit Hämatoxylin gegengefärbt. Wieder wird der Farbstoff mit ddH₂O abgewaschen. Anschließend wird für eine Minute mit NH₄OH (2ml NH₄OH in 98ml ddH₂O) inkubiert und erneut mit ddH₂O abgewaschen. Um die Schnitte zu dehydrieren, werden Objektträger jeweils für zwei Minuten in 70% EtOH, 95% EtOH und 99% EtOH getaucht. Dann werden die Schnitte luftgetrocknet und mit einem Einbettmedium bedeckt. Eine vollständige Trocknung wird durch die Inkubation für zehn Minuten bei 80°C erreicht. Das gefärbte Gewebe wird mit Hilfe eines Leica- Lichtmikroskops von zwei geblindeten Pathologen untersucht und bezüglich des Ausmaßes der Entzündung wie folgt beurteilt: - keine Entzündung; +/- wenige mononukleäre Zellen; + Organisation von Entzündungszellen um die Gefäße; ++ ausgeprägtes perivaskuläres Infiltrat von Entzündungszellen; +++ ausgeprägtes perivaskuläres Infiltrat von Entzündungszellen mit Infiltration in die Graue Substanz (39, 44). Die histologischen Bilder werden mit Hilfe einer CCD-Kamera und eines Bildverarbeitungsprogrammes (Spot 2.0 advanced, Diagnostic Instruments Inc, Sterling Heights, MI) angefertigt.

2.8 Immunofluoreszenz-Färbung und Zellzahlbestimmung

Zum Zeitpunkt des Experiments, also kurz nachdem die Mäuse getötet wurden, werden die Gehirne entnommen und, eingebettet in OCT, in 2-Methylbutan schockgefroren. Dann werden 5µm-Schnitte des Gehirngewebes mit 4% Paraformaldehyd für zehn Minuten fixiert und anschließend mit PBS/1%BSA (pH 7,4) für fünf Minuten geblockt. Nach der Blockierung werden die Schnitte mit dem Fluorochrome-konjugierten Antikörper in einer feuchten Box für 25-35Min inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS werden die Schnitte im Anschluss daran mit einem Ausbleichschutz beschichtet und ein Deckglas darüber gelegt. Als Antikörper werden (siehe Kapitel 3.2.6) anti-Maus-CD3, -CD19, -MAC-1 (-CD11b) und -F4/80 verwendet. Mit Hilfe

eines Leica-Fluoreszenz-Mikroskops, einer CCD-Kamera mit 400facher Vergrößerung und eines Bildverarbeitungsprogrammes (Spot 2.0 advanced, Diagnostic Instruments Inc, Sterling Heights, MI) werden Bilder von den Antikörper-markierten Schnitten gemacht. Die Schnitte werden von zwei geblindeten Pathologen folgendermaßen analysiert: Markierte T-Zellen (CD3), B-Zellen (CD19) und Makrophagen/Mikroglia (MAC-1, F4/80) werden in vier Schnitten aus unterschiedlichen Niveaus der Neuraxis gezählt. Pro Schnitt werden dazu vier Entzündungslozi ausgewählt (meningeal, perivaskulär, zwischen zwei Gyri und in der Grauen Substanz) und die Zahl der gefärbten Zellen (z.B. CD3 positiv) pro Lokus gezählt. Das Resultat wird berechnet als der Mittelwert mit Standardabweichung der Zellzahl in den Entzündungslozi für alle unterschiedlichen Hirnniveaus von mehreren Mäusen einer Gruppe.

2.9 Evaluation der Färbeintensität

Die Evaluation der Expression von Oberflächenadhäsionsmolekülen, VCAM-1 und ICAM-1, in Gehirngefäßen wird nach einem Protokoll von Kaifi et al. (55) durchgeführt. Dazu werden, nach der Immunfluoreszenz-Färbung mit VCAM-1 und ICAM-1, mit Hilfe eines Leica-Fluoreszenz-Mikroskops und einer CCD-Kamera mit 400facher Vergrößerung Bilder von gefärbten Schnitten angefertigt. Um die Intensität der Färbung bestimmen zu können, bedient man sich der Fluoreszenz-Intensitätsmessung von Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, San Jose, CA). Dazu wird eine fixierte Fläche (200 Pixel) auf die mittlere Helligkeit eines Fluoreszenz-Kanals (grün = FITC bzw. rot = PE) hin untersucht. Die Färbung des Hintergrunds wird von diesem Wert abgezogen. Um eine repräsentative Intensität zu bekommen, werden drei Gebiete eines Gefäßes, vier Gefäße pro Schnitt und vier Schnitte pro Maus evaluiert und dann wird der Mittelwert mit der Standardabweichung über mehrere Mäuse für jeweils die Experimental- und die Kontrollgruppe berechnet.

2.10 TUNEL-Assay

Apoptose ist ein physiologischer Vorgang von Zellen, der auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird. Der TUNEL-Test (“Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling”) wurde erstmals von Gavrieli et al. 1992 (40) eingeführt und beruht auf einer Markierung von DNS-Einzelstrangbrüchen, einem

typischem Merkmal der DNS-Spaltung in apoptotischen Zellen. Die schematische Darstellung der einzelnen Reaktionsschritte ist in Abb. 9 gezeigt.

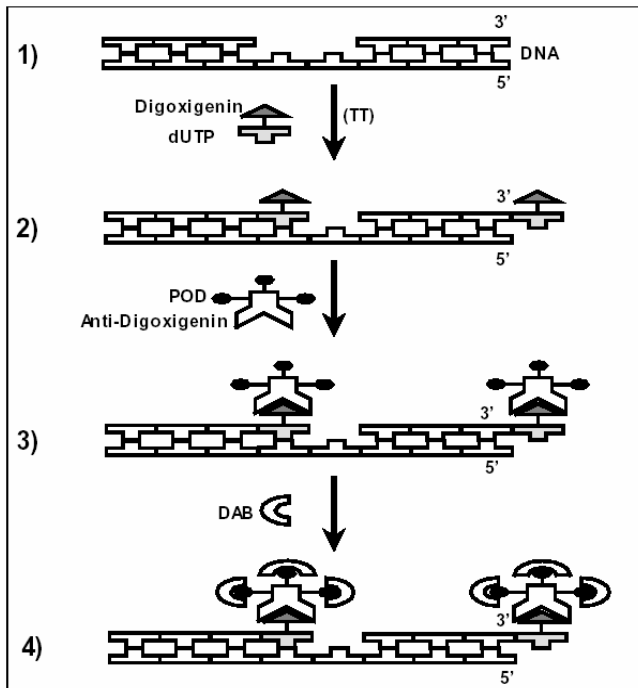
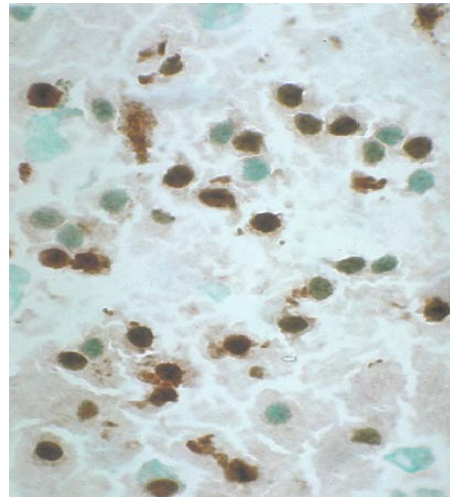


Abb. 9

Schema des TUNEL-Assays und Ausschnitt aus einem gefärbten Präparat.



Das Prinzip der Methode besteht darin, dass mittels des Enzyms Terminale Transferase mit Digoxigenin gekoppelte Nukleotide dUTP (desoxyUridintriphosphat) an 3'-OH-Enden von DNA-Einzel- und Doppel-Strangbrüchen gebunden werden (Abb. 9:1, 9:2). In einer folgenden Antigen-Antikörper-Reaktion (Abb. 9:3) wird Anti-Digoxigenin, welches mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist, an das Digoxigenin gebunden. Im letzten Reaktionsschritt (Abb. 9:4) wird der markierte Strangbruch mittels des an den Antikörper gekoppelten Enzyms Peroxidase und eines geeigneten Farbsubstrats, z.B. Diaminobenzidin, visualisiert. Die markierten Zellkerne sind dann im Durchlicht-Mikroskop anhand der braunen Färbung zu erkennen (40). In den vorliegenden Versuchen wurde ein Versuchssset der Firma FD Neuro Technologies benutzt. Im Folgenden wird die Vorgehensweise bei der Benutzung des Versuchsets beschrieben. Zunächst wird das zu untersuchende Gewebe vorbereitet, in dem es in OCT schockgefroren, in 20µm-Schnitte geteilt und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 30Min fixiert wird. Nachdem die Schnitte dreimal in 0,01M PBS für zehn Minuten gewaschen wurden, werden sie mit einem Verdauungsenzym für zehn Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend mit ddH₂O dreimal gewaschen. Dann wird für 20Min ein

Equilibrierungspuffer aufgetragen, um anschließend für 50Min bei 30°C in einer feuchten Box mit der vorgefertigten Reaktionsmischung zu inkubieren. Als Positivkontrolle wird ein Schnitt zusätzlich mit einer DNase inkubiert. Nach dem erneuten dreimaligen Waschen mit 0,01M PBS wird das Detektionsreagenz aufgetragen und für 30Min auf den Schnitten belassen. Anschließend wird das Chromogen für fünf bis zehn Minuten aufgetragen. Nach dem Waschen mit ddH₂O kann noch eine Gegenfärbung mit Methylgrün vorgenommen werden, um das Gewebe besser sichtbar zu machen. Eine zusätzliche Färbung für Oberflächenantigene (CD11b, CD19, CD4, F4/80) ermöglicht die Identifizierung der Zellart, die von der Apoptose betroffen ist. Das Gewebe wird anschließend in Alkohol und Xylene getrocknet und mit einem Einbettmedium bedeckt.

Die Sensitivität dieser Methode ist extrem hoch. Im Prinzip kann jede einzelne apoptotische Zelle identifiziert werden und das bereits in einer sehr frühen Phase der Apoptose. Die Beurteilung der gefärbten Schnitte erfolgt durch zwei unabhängige, geblindete Pathologen.

2.11 Statistik

Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. Die statistischen Werte wurden mit Hilfe der SigmaStat® Software (SPSS Inc., Chicago, IL) errechnet. Es wurden t-Tests, gepaarte t-Tests, Mann-Whitney-Rank-Sum-Tests sowie Chi-Quadrat-Tests durchgeführt.

3 Untersuchungsgut

3.1 Versuchstiere

3.1.1 SJL/J-Mäuse

Weibliche SJL/J (Swiss Jim Lambert)-Mäuse im Alter zwischen sechs bis zehn Wochen wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) bezogen. Es handelt sich bei den SJL/J-Mäusen um einen Inzuchtstamm, der sich als sensibel für die Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) erwiesen hat und sich deshalb besonders gut für die Multiple-Sklerose-Forschung eignet.

3.1.2 C57BL/6J-Mäuse

Weibliche C57BL/6J (Black 6)-Mäuse im Alter zwischen fünf bis acht Wochen wurden ebenfalls von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) bezogen.

Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in den Einrichtungen für Versuchstiere in der Case Western Reserve University in Cleveland, Ohio untergebracht. Die Tiere wurden entsprechend der Richtlinien des „Institutional Care and USE Committee (IACUC)“ der Case Western Reserve University gehalten.

3.2 Material

3.2.1 Immunisierungsreagenzien

- PLPp139-151: immunodominantes Peptid des Proteolipid-Proteins der Myelinscheide in SJL/J-Mäusen (Research Genetics); Sequenz (N→C): HCLGKWLGHDPKF
- MOG 35-55: immunodominantes Peptid des Myelo-Oligodendrozyten-Glykoproteins in C57BL/6J-Mäusen (Research Genetics); Sequenz (N→C): MEVGWYRSPFSAVVHLYRNGK

- HEL: Hen Egg Lysozyme, Muramidase des Hühner-Eiweißes (Boehringer Mannheim GmbH, Nr.83525822)
- Komplettes Freund-Adjuvans:
 - Inkomplettes Freund-Adjuvans (Gibco BRL, Nr. 15720-030), bestehend aus 850ml Paraffinöl und 150ml Arlachel
 - Mycobacterium tuberculosis H37 Ra (Difco Laboratories, Nr. 3114-33-8) in einer Konzentration von 5mg/ml
- Pertussistoxin #180 (List Biological Laboratories, Inc., Nr. 180166A): 50µg gelöst in 0,5ml Kochsalzlösung
- Antikörper zur Injektion

Name	Klon	Typ	Hersteller
Purified monoclonal mouse anti-MIF antibody III.D.9	XIV.15.5	IgG1	Metz et al.
Purified monoclonal mouse antibody HB-49	5D4-11	IgG1	ATCC

3.2.2 ELISPOT

- PBS:
 - 330ml Lösung A (48 g NaH₂PO₄ monobasisch in zwei Litern H₂O)
 - 670ml Lösung B (107,3 g Na₂HPO₄ dibasisch in zwei Litern H₂O)
 - 148g NaCl Enzyme Grade (Fisher Scientific, BP358-1)
- PBS/ 1%BSA (Enzyme Grade, fraction V):
10g Albumin, Bovine Fraction V Powder (Sigma Chemical, A-1933) in einem Liter PBS
- PBS/ Tween:
500µl von Tween 20 Enzymgrad (C₅₈H₁₁₄O₂₆) (Fisher Scientific, BP337-100) in einem Liter PBS
- PBS/ Tween/ BSA:
10g Albumin und 500µl Tween 20 in einem Liter PBS
- Erster Antikörper

Name	Klon	Typ	Hersteller	Kat.-Nr.
Purified rat anti-mouse IL-2	JES6-1A12	IgG2a	PharMingen	554424
Purified rat anti-mouse IL-4	BVD4-1D11	IgG2b	PharMingen	554393

Purified rat anti-mouse IL-5	TRFK 5	IgG1	PharMingen	554409
Purified rat anti-mouse IFN γ	XMG 1.2	IgG1	PharMingen	554400

- Zweiter Antikörper

Name	Klon	Typ	Hersteller	Kat.-Nr.
Biotinylated rat anti-mouse IL-2	JES6-5H4	IgG2a	PharMingen	554424
Biotinylated rat anti-mouse IL-4	BVD6-2462	IgG2b	PharMingen	554393
Biotinylated rat anti-mouse IL-5	TRFK 4	IgG1	PharMingen	554409
Biotinylated rat anti-mouse IFN- γ	XMG 1.2	IgG1	PharMingen	554400

- Dritter Antikörper: Streptavidin-Alkyl-Phosphatase (Dako Corporation Nr. D0396)
- Tuberculin Purified Protein Derivative: isotonische Lösung von Tuberkulin in PBS, die zusätzlich 0,0005% Tween 80 als Stabilisator und 0,28% Phenol zur Konservierung enthält
- Anti-CD3-Antikörper: gewonnen von eigenen Hybridomen (2CII)
- Komplettes HL-1-Medium
 - HL-1 (Biowhittaker, Nr. 344017): serum-freies Kulturmedium für Hybridome und lymphoide Zellen
 - L-Glutamin 200mM (Gibco BRL, Life Technologies, Nr. 250030-081): 1%
 - Gentamycin 50mg/ml (Gibco BRL, Life Technologies, Nr. 15750-060): 0,1%
- DMEM-Medium (Dulbecco's modified eagle's medium) mit 4,5g/l Glukose (Biowhittaker, Nr.: 12-614F)
- NBT (nitroblue tetrazolium chloride)-Lösung: 0,25g NBT (Biorad, Nr. 170-6532) in 5ml 70% DMF (N,N-Dimethyl Formamide; Fisher Scientific, D119-500)

- BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate)-Lösung: 0,25g BCIP (Sigma, B0274) in 5ml 100% DMF (N,N-Dimethyl Formamide; Fisher Scientific, D119-500)
- NBT-Puffer: pH 9,5; gelöst in einem Liter ddH₂O
 - 12,11g Tribase
 - 5,89g NaCl
 - 1,0g MgCl₂
- Mouse T Cell CD4 Column Kit (Research Diagnostics, Nr. MCD4C-1000)
- ELISPOT-Platten (Immunospot, Cellular Technology, Cleveland, OH, USA)

3.2.3 ELISA

- Coating Puffer: 0.1M Bicarbonate, pH 7,0; gelöst in einem Liter ddH₂O
 - 4,24g Na₂CO₃
 - 5,04g NaHCO₃
 - 0,10g NaN₃
- ELISA final wash: pH 7,5; gelöst in einem Liter ddH₂O
 - 12,07g Trisbase
 - 17,50g NaCl
 - 0,40g NaN₃
- Working solution: PBS/Tween + 10% of 10x Gelatine (1g Gelatine (Sigma, Nr. 6144) in 100ml PBS/Tween)
- PNPP (p-Nitrophenyl phosphate disodium salt X 6H₂O; Research Genetics, Inc, Nr. 0446N-3)
- PNPP Buffer: pH 10,3; gelöst in zwei Litern ddH₂O
 - 16,80g NaHCO₃
 - 0,20g NaN₃
 - 1,35ml 4,9 M MgCl₂ – 6 H₂O
- Erster Antikörper

Name	Klon	Typ	Hersteller	Kat.-Nr.
Purified rat anti-mouse IL-6	MP5-20F3	IgG1	PharMingen	554400
Purified rat anti-mouse IL-10	JES5-2A5	IgG1	PharMingen	554422

Purified rat anti-mouse TNF α	MP6-XT22	IgG1	PharMingen	554416
Purified rat anti-mouse IL-12 (p40/p70)	C15.6	IgG1	PharMingen	554478

- Zweiter Antikörper

Name	Klon	Typ	Hersteller	Kat.-Nr.
Biotinylated rat anti-mouse IL-6	MP5-32C11	IgG2a	PharMingen	554402
Biotinylated rat anti-mouse IL-10	SXC-1	IgM	PharMingen	554423
Biotinylated rat anti-mouse TNF α	MP6-XT3	IgG1	PharMingen	554415
Biotinylated rat anti-mouse IL-12 (p40/p70)	C17.8	IgG2a	PharMingen	554476

- Dritter Antikörper (siehe ELISPOT)

3.2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

- Becton Dickinson FACScan mit CELLquest-Software
- Coulter-PBS: 500ml ddH₂O vermischt mit Coulter-Clone-PBS-Puffer-Reagenz (Coulter Clone, Nr. 6603369)
- Coulter Immuno-Lyse (Coulter Clone, Nr. 6602490)
- Fixans (Coulter Clone, Nr. 6604473)
- Fetales bovines Serum (Hyclone Lab., Nr. SH300.70.03)
- Normales Maus-Serum (biØmeda corp., Nr. MS007)
- Fluoreszenz-Antikörper

Name	Klon	Typ	Hersteller	Kat.-Nr.
PE labeled rat anti-mouse CD11b	M1/70	IgG2b	PharMingen	557397
PE labeled rat anti-mouse CD4	GK1.5	IgG2b	PharMingen	553730

3.2.5 H&E-Färbung

- Eosin (Sigma, E8761)
- Hämatoxylin (Sigma, H3136)
- Formalin-Lösung (Sigma, HT50-1-640)
- Paraffin-Wax (Riedel, 33509)

3.2.6 Immunfluoreszenz-Färbung

- Fixierung: 4% Paraformaldehyd/ Sucrose/ PBS: pH 7,5
 - 4g Paraformaldehyd (Sigma, P6148) in 50ml doppelt-destilliertem-H₂O (ddH₂O)
 - 20g Sucrose, Ultra Centrifugation Grade (Sigma, BP 220-1) in 40ml ddH₂O
 - 10ml of 10xPBS
- PBS/ 0,5%BSA: 5g BSA in einem Liter PBS (siehe PBS/1%BSA unter 5.3.1)
- Fluoreszenz-Antikörper

Name	Klon	Typ	Hersteller	Kat.-Nr.
PE labeled rat anti-mouse CD11b	M1/70	IgG2b	PharMingen	557397
PE labeled hamster anti-mouse CD3e	I45-2C11	IgG	PharMingen	553064
PE labeled hamster anti-mouse CD54 (ICAM-1)	3E2	IgG1	PharMingen	553253
FITC labeled rat anti-mouse CD19	ID3	IgG2a	PharMingen	553785
FITC labeled rat anti-mouse F4/80	C1-A3-1	IgG2b	Serotec, Oxford, UK	MCA49 7F
FITC labeled rat anti-mouse CD106 (VCAM-1)	429	IgG2a	PharMingen	553332
PE labeled rat anti-mouse CD31 (PCAM-1)	MEC13.3	IgG2a	PharMingen	553373

- Gelmount: wässriges Einbettmedium mit Ausbleichschutz (biØmeda corp., Nr. MØ1)
- OCT Compound: Einbettmedium für gefrorenes Gewebe (Sakura Finetechnical Co., Ltd., Nr. 4583)

3.2.7 Apoptose-Bestimmung

- FD NeuroApop Kit (FD Neurotechnologies, PK201)
- PBS/ 1%BSA und PBS (siehe 3.2.1)
- RQ1 DNase I (Promega, M160 A)

4 Ergebnisse

4.1 Behandlung der akuten EAE mit anti-MIF-mAK

Die Rolle von MIF in der Pathogenese der EAE und als möglicher Angriffspunkt in der Therapie derselben wurde bis dato noch nicht untersucht.

Zunächst war in der vorliegenden Arbeit zu klären, ob MIF überhaupt in der Pathogenese von EAE in Mäusen Bedeutung hat. Studien, die erhöhte Werte von MIF im Liquor von MS Patienten zeigen (102), lassen diese Annahme zu.

Um diese erste grundlegende Fragestellung zu bearbeiten, wurden sechs bis acht Wochen alte SJL-Mäuse mit dem immunodominanten H-2^S-restringierten PLPp139-151 in CFA subkutan immunisiert und zusätzlich an Tag null und Tag eins mit PT intraperitoneal injiziert. Für das in Abb. 10A gezeigte Experiment wurden die Mäuse randomisiert, in zwei Gruppen eingeteilt und ab Tag sechs jeden zweiten Tag intraperitoneal mit anti-MIF-mAK (weiße Symbole) oder Kontroll-mAK (schwarze Symbole) behandelt. Der Tag sechs wurde zur Initiierung der Antikörper-Behandlung gewählt, da zu diesem Zeitpunkt davon ausgegangen werden kann, dass PLPp139-151-reaktive T-Zellen bereits aktiviert, aber noch nicht ins ZNS gelangt sind, wo sie die Krankheitssymptomatik auslösen. Die Mäuse wurden für die Dauer von drei Wochen auf ihre klinischen Symptome hin beobachtet (siehe Kapitel 2.2).

Die Ergebnisse sind in Form eines repräsentativen Experiments in Abb. 10A und einer Tabelle (Tabelle 1) dargestellt. In der Tabelle werden vier unabhängige Experimente mit insgesamt 33 Mäusen zusammengefasst. Jedes Experiment im Einzelnen analysiert, zeigt statistisch signifikante Ergebnisse. Interessanterweise sieht man, dass die Injektion von anti-MIF-mAK die klinischen Symptome der EAE signifikant bessert. Die Inzidenz und der Mittelwert des klinischen EAE-Grades waren in den anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen signifikant geringer verglichen mit den Kontroll-Mäusen (Tabelle 1, Inzidenz 81,8% versus 100%, mittlere EAE-Grad von $2,7 \pm 0,2$ versus $3,9 \pm 0,2$). Ebenso war die Dauer eines Krankheitsschubs signifikant verkürzt ($7,0 \pm 0,7$ Tage versus $10,0 \pm 0,4$ Tage). Unterschiede zeigten sich auch in der Mortalität: 21,2% in den anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen versus 48,5% in den Kontroll-Mäusen. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die Behandlung mit anti-MIF-mAK im

vorliegenden Modell effektiv ist, wenn sie vor dem ersten Auftreten von Krankheitssymptomen initiiert wird.

Jedoch kann, wie bereits einleitend erwähnt (Kapitel 1.1.7), eine Behandlung von MS-Patienten erst nach dem ersten Auftreten von Symptomen begonnen werden. Deshalb wurde ein Experiment konzipiert, in dem die Mäuse erst nach der Entwicklung von klinischen Symptomen mit Antikörpern behandelt wurden. Dieser Versuchsaufbau sollte die Frage beantworten, ob die Behandlung mit anti-MIF-mAK auch nach dem Beginn der EAE-Symptome eine Wirkung zeigt.

In Abb. 10B wurden erneut SJL/J-Mäuse, im Alter von sechs bis acht Wochen, immunisiert und an Tag null und Tag eins mit PT behandelt. Nach der Entwicklung von klinischen Symptomen wurden die Mäuse randomisiert und in zwei Gruppen mit etwa gleichem EAE-Grad eingeteilt. Von Tag elf an, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Symptome der Erkrankung in der Regel bereits deutlich ausgeprägt sind, wurde in dieser Versuchsanordnung an jedem zweiten Tag intraperitoneal anti-MIF-mAK (offene Symbole) oder Kontroll-mAK (geschlossene Symbole) injiziert. Auch diese Mäuse wurden über drei Wochen beobachtet.

Wie in der Abb. 10B dargestellt, zeigten die mit anti-MIF-mAK-behandelten Mäuse innerhalb von 24 bis 48 Stunden eine signifikante Besserung der Symptome. Die meisten Mäuse kamen innerhalb von drei bis vier Tagen in die Remission. Im starken Gegensatz dazu verschlechterte sich die Krankheitssymptomatik in den Kontroll-Mäusen massiv und die zu erwartende Erholung zwischen den Schüben setzte erst deutlich später ein (mittlerer EAE-Grad: $2,6 \pm 0,2$ in den Kontroll-Mäusen versus $1,6 \pm 0,2$ in den anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen; Krankheitsdauer: $14,9 \pm 1,3$ Tage versus $8,7 \pm 1,1$). Das Experiment wurde dreimal ($n_{\text{gesamt}} = 24$ Mäuse pro Gruppe) mit gleichen Ergebnissen wiederholt. In Abb. 10B ist ein repräsentatives Experiment mit sechs Mäusen pro Gruppe gezeigt. Der Unterschied im klinischen Grad zwischen den beiden Gruppen ist statistisch signifikant.

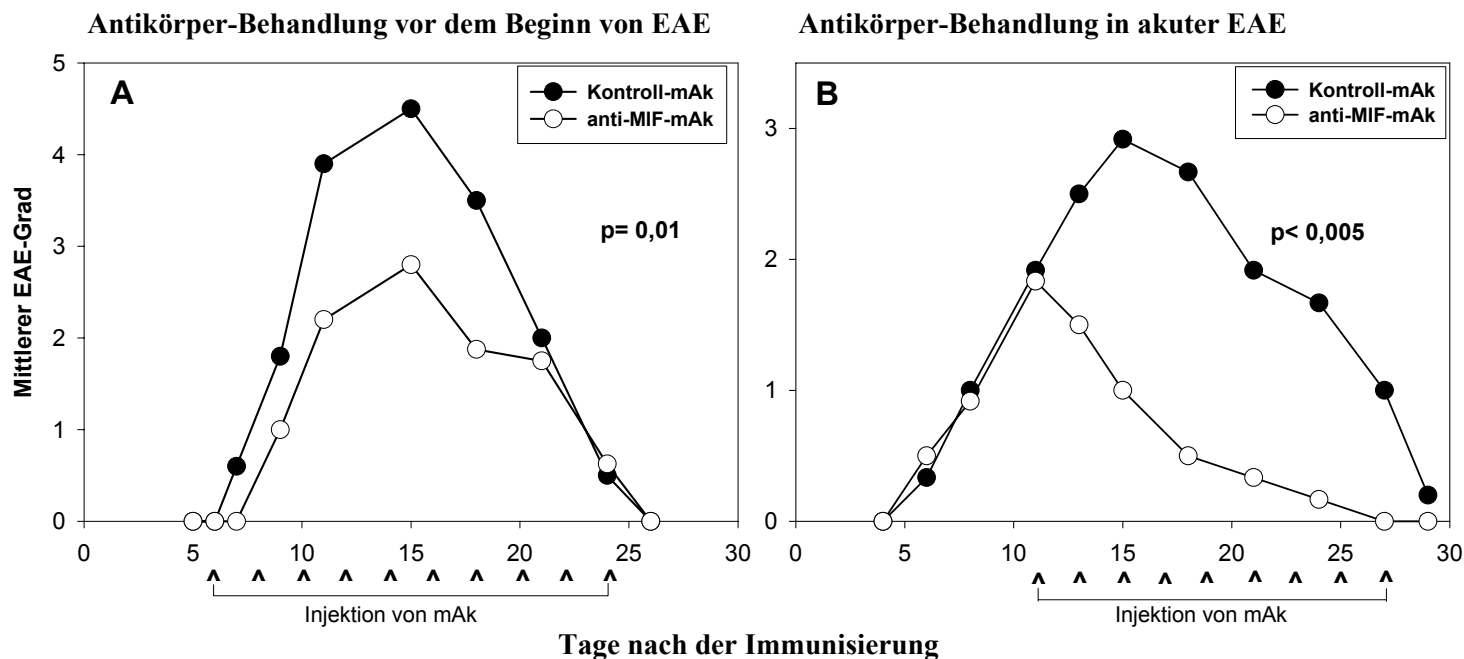


Abb. 10 Anti-MIF-mAK-Behandlung bessert die Symptomatik von EAE in Mäusen.

Sechs bis acht Wochen alte SJL/J-Mäuse wurden mit PLPp139-151 in CFA und mit PT immunisiert (siehe Kapitel 2.1). Die Mäuse wurden randomisiert und in zwei Gruppen eingeteilt (Abb. 10A). Für Abb. 10B wurden die Mäuse auf ihre klinischen Symptome beobachtet und dann an Tag elf randomisiert und in zwei Gruppen mit der etwa gleichen durchschnittlichen Ausprägung von EAE eingeteilt. Ab Tag sechs (Abb. 10A) beziehungsweise Tag elf (Abb. 10B) wurde die Gruppe, die in den beiden Abbildungen mit weißen Punkten dargestellt ist, mit anti-MIF-mAK behandelt. Der anderen Gruppe wurde Kontroll-mAK injiziert (schwarze Punkte). Gezeigt sind die durchschnittlichen klinischen EAE-Grade für jeweils ein repräsentatives Experiment, wobei beide Experimente jeweils vier- beziehungsweise dreimal ($n_{\text{gesamt}} = 33$ (A) bzw. 24 (B)) unabhängig voneinander durchgeführt wurden. Der p-Wert wurde aus dem mittleren EAE-Grad aller Mäuse beider Gruppen zu mehreren Zeitpunkten nach Injektion des jeweiligen Antikörpers über die Dauer des Krankheitsschubs errechnet.

Tabelle 1 Effekte der anti-MIF-mAK-Behandlung auf die Entwicklung von EAE

<u>Behandlung</u>	<u>Inzidenz (%)</u>	<u>Beginn (Tag)</u>	<u>Dauer (Tag)</u>	<u>EAE-Grad</u>	<u>Letalität (%)</u>
Kontroll-mAK	100,0 (33/33)	10,0 ± 0,4	10,0 ± 0,4	3,9 ± 0,2	48,5 (16/33)
Anti-MIF-mAK	81,8 (27/33) (p< 0,03)	11,1 ± 0,3 (p> 0,05)	7,0 ± 0,7 (p< 0,001)	2,7 ± 0,2 (p< 0,001)	21,2 (7/33) (p< 0,05)

Die Mäuse wurden mit PLPp139-151/CFA (subkutan) und PT (ip) injiziert und geblindet nach klinischen Symptomen beurteilt. Anti-MIF-mAK oder Kontroll-mAK wurden ab Tag sechs jeden zweiten Tag injiziert. (Beginn: der Tag, an dem die jeweilige Maus einen klinische EAE-Grad von eins oder mehr erreichte; Dauer: Tage, bis die jeweilige Maus in die erste Remission kam; Klinischer EAE-Grad: das durchschnittliche Maximum, das von den Mäusen erreicht wurde (mindestens größer/ gleich eins)). Zusammengefasst sind vier unabhängige Experimente, die jeweils für sich signifikante Unterschiede ergaben.

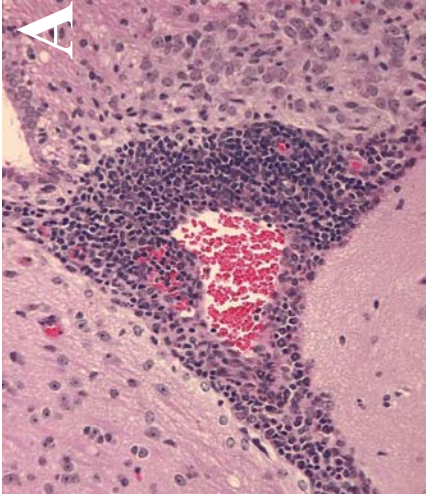
4.2 Histopathologie des ZNS

Um den Effekt der anti-MIF-mAK- oder Kontroll-mAK-Behandlung auf die Pathologie im ZNS zu untersuchen, wurden repräsentative Mäuse von beiden Gruppen zu mehreren Zeitpunkten im Verlauf der Erkrankung getötet und Schnitte aus verschiedenen Teilen des Gehirns angefertigt (siehe Kapitel 2.7 und 2.8).

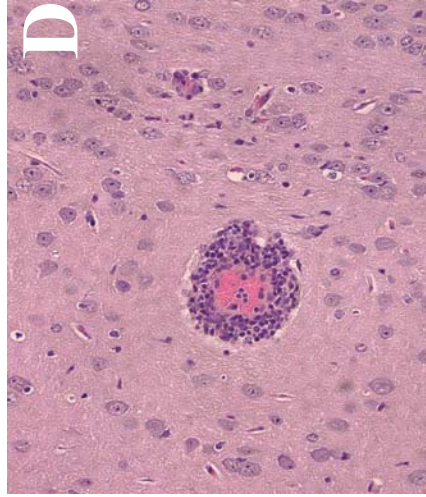
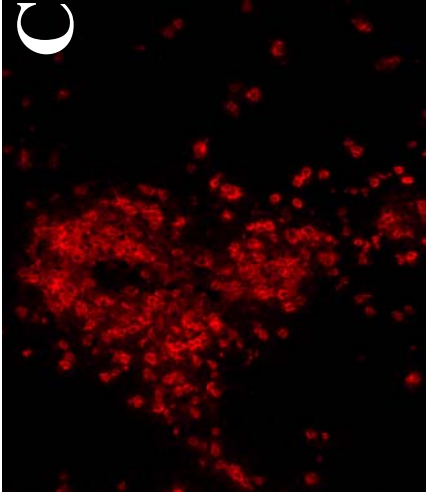
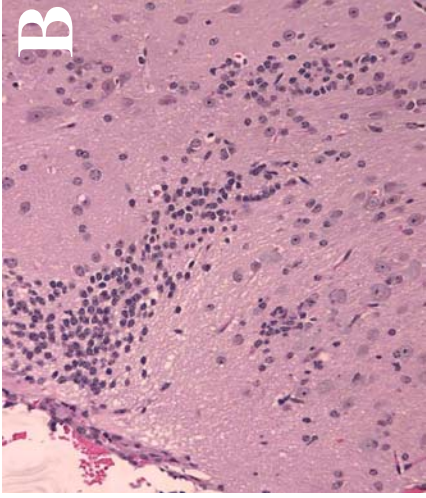
Wie in Abb. 11 dargestellt, zeigen die Kontroll-Mäuse (A-C) in der H&E-Färbung extensive perivaskuläre und periventriculäre Infiltrationen (A), die sich in die Graue Substanz ausdehnen (B). Im Gegensatz dazu zeigen die anti-MIF-mAK-behandelten Mäuse (D-F) eine geringere Entzündungsreaktion. Es sind weniger Entzündungszellen vorhanden (D), und diese sind ausschließlich perivaskulär lokalisiert. Eine Infiltration ins Parenchym ist nicht zu finden (E). Die Immunfluoreszenz-Färbung mit einem PE-markierten anti-CD4-Antikörper bestätigt, dass es sich bei den Infiltrationen größtenteils um CD4⁺-T-Lymphozyten handelt (C, F).

Die Resultate zeigen, dass die Behandlung mit anti-MIF-mAK während der akuten Phase von EAE in Mäusen wirksam ist, dass sie die Schwere der Erkrankung mildert, die Dauer eines Schubs verkürzt und die Entzündungsreaktion verbunden mit der Zellinfiltration im ZNS vermindert.

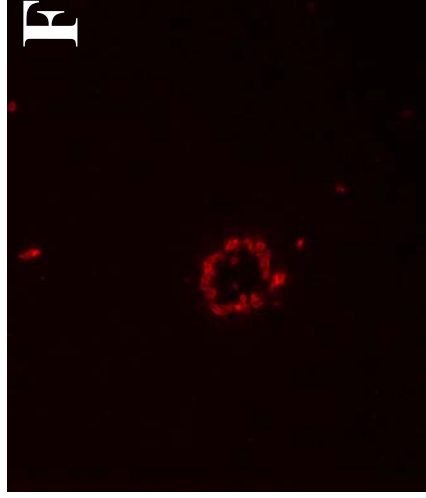
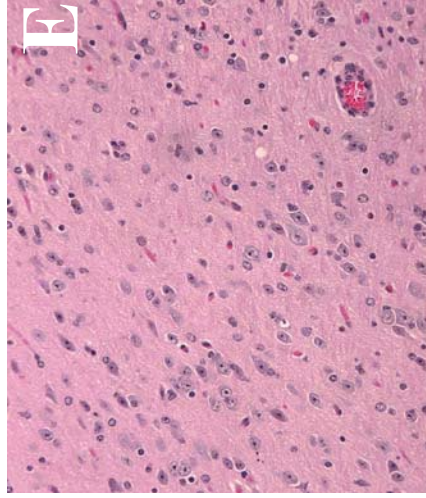
Verschiedene Mechanismen können für den beobachteten Effekt des anti-MIF-mAK in der Behandlung der akuten EAE verantwortlich sein: Zum einen könnte die Neutralisierung von MIF das "Priming", die klonale Expansion oder die Effektorfunktionen von neuroantigen-spezifischen T-Zellen beeinflussen. Zum anderen kann die Antikörperbehandlung die Rekrutierung von neuroantigen-spezifischen T-Zellen zum ZNS behindern. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die MIF-Neutralisierung die Effektorfunktion von Antigen-Präsentierenden Zellen (APZ) im Gehirn beeinträchtigt. Schlussendlich können auch immunoregulatorische Mechanismen durch die Behandlung in Gang gesetzt werden.



Kontroll-
mAk-
behandelte
Maus



anti-MIF-
mAk-
behandelte
Maus



Perivaskuläre
Infiltration

Infiltration in die
Graue Substanz

Infiltrierende Lymphozyten
sind CD4+-T-Zellen

Abb. 11 Anti-MIF-mAK verändert die Histopathologie im ZNS

Histologische Analyse H&E-gefärbter Gehirnabschnitte von repräsentativen SJL/J-Mäusen mit akuter EAE. Beginnend an Tag elf nach der Immunisierung wurde mit Kontroll-mAK (A-C) oder anti-MIF-mAK (D-F) behandelt. Die Kontroll-Mäuse zeigen eine umfangreiche perivaskuläre Infiltration (A), die sich in die Graue Substanz ausdehnt (B). Die Immunfluoreszenzfärbung beweist, dass es sich um CD4⁺-T-Zellen handelt (C). Anti-MIF-mAK-behandelte Mäuse demonstrieren erheblich weniger perivaskuläre Entzündung und keine Infiltration der Zellen in das Parenchym (D-F).

4.3 T-Zell-Infiltration in das ZNS

MIF steigert die Expression von Chemokinen, Chemokin-Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen (59, 144), die an der T-Zell-Migration zu Orten der Entzündung beteiligt sind.

Aufgrund der veränderten Histopathologie (Kapitel 4.2) ist eine verminderte T-Zell-Infiltration ins ZNS auch im vorliegenden Modell anzunehmen. Um dies weiter zu untersuchen, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt. EAE wurde induziert (Kapitel 2.1) und die Mäuse wurden ab Tag sechs jeden zweiten Tag mit dem Antikörper behandelt. Da das Auftreten von klinischen Symptomen in diesem Modell mit der Einwanderung von neuroantigen-spezifischen CD4⁺-T-Zellen assoziiert ist (72), ist durch diesen Experiment-Aufbau die Migration der ersten pathogenen Zellen bereits unter dem Einfluss der Antikörper-Behandlung stehen. Die Akkumulation von Entzündungszellen im Gehirn dieser Mäuse wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurde repräsentativen Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Versuchs das Gehirn entnommen und kryofixiert. Von den Gehirnen wurden 5µm-Schnitte in unterschiedlichen Niveaus der Neuraxis angefertigt, die mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern (CD3, CD19, MAC-1, F4/80) angefärbt wurden. Pro Schnitt wurden vier Entzündungslozi ausgewählt (meningeal, perivaskulär, zwischen zwei Gyri und in der Grauen Substanz) und die Zahl der gefärbten Zellen (z.B. CD3⁺) pro Lokus ausgezählt. Das Resultat wird berechnet als der Mittelwert der Zellzahl mit Standardabweichung in den Entzündungslozi für alle unterschiedlichen Hirnniveaus von mehreren Mäusen einer Gruppe. Abb. 12A zeigt die signifikante Abnahme ($p < 0,015$) der CD3⁺-T-Zellen in den anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen

gegenüber den Kontroll-Mäusen, während die Zahl der CD11b⁺/ F4/80⁺-APZ in beiden Gruppen ähnlich ist ($p > 0,10$).

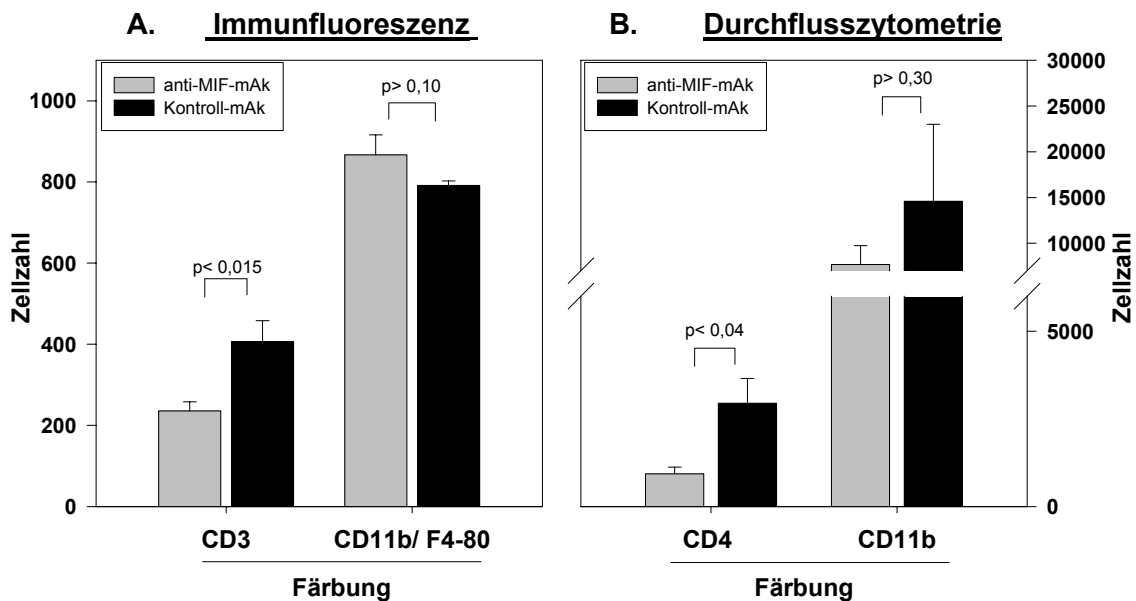


Abb. 12 Anti-MIF-mAK-Behandlung vermindert die T-Zell-Infiltration im Gehirn

Sechs bis acht Wochen alte SJL/J-Mäuse wurden mit PLPp139-151 in CFA und PT immunisiert. Die Mäuse wurden randomisiert und in zwei Gruppen eingeteilt, um sie anschließend ab Tag sechs jeden zweiten Tag mit mAK zu behandeln. Eine Gruppe erhielt anti-MIF-mAK (graue Balken), die andere Kontroll-mAK (schwarze Balken). Nach drei Wochen wurden die Gehirne entnommen und mehrere Schnitte aus verschiedenen Bereichen mit anti-CD3-, CD4-, CD19-, CD11b- oder F4/80-mAK gefärbt und ausgezählt (Abb. 12A, siehe Kapitel 2.8). Abb. 12B stellt das Ergebnis einer Durchflusszytometrie von Rückenmarkszellen dar. Es wurde dabei CD4 beziehungsweise CD11b markiert (siehe Kapitel 2.8). CD19⁺-Zellen konnten in beiden Experimenten nicht nachgewiesen werden. Die Resultate wurden in jeweils drei unabhängigen Experimenten mit sechs bis zehn Mäusen pro Gruppe wiederholt.

Um die Daten zusätzlich mit Hilfe einer anderen Methode zu bestätigen, wurde eine Durchflusszytometrie zur Untersuchung von Zellen des Rückenmarks (Abb. 12B) aus gleichermaßen vorbehandelten Mäusen durchgeführt (siehe Kapitel 2.6). Auch in diesem Experiment wurde ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der CD4⁺-T-Zellen ($p < 0,04$) in anti-MIF-mAK- oder Kontroll-mAK-behandelten Mäusen gefunden, während die CD11b⁺-Zellen in annähernd gleicher Quantität in beiden Gruppen vorhanden waren ($p > 0,30$). CD19⁺-Zellen konnten in beiden Experimenten nicht nachgewiesen werden. Die Gesamtzahl der Zellen und der Anteil von T-Zellen, B-

Zellen oder Makrophagen in der Milz war in Experimental- und Kontrollgruppe vergleichbar, so dass ausgeschlossen werden konnte, dass es sich lediglich um eine Reduzierung der Gesamtzahl an CD4⁺-T-Zellen handelte.

4.4 Andere Modelle und Neuroantigene

Um zu untersuchen, ob gleiche Resultate auch in anderen Mausstämmen gewonnen werden können, wurden C57BL/6-Mäuse mit MOGp35-55 nach gleichem Zeitprotokoll immunisiert und beobachtet. Auch in diesen Experimenten fand sich ein signifikanter Unterschied im Krankheitsverlauf und in der Infiltration ins Gehirn (Abb.13), was die Ergebnisse aus den Versuchen mit den SJL-Mäusen bestätigte (Abb.10).

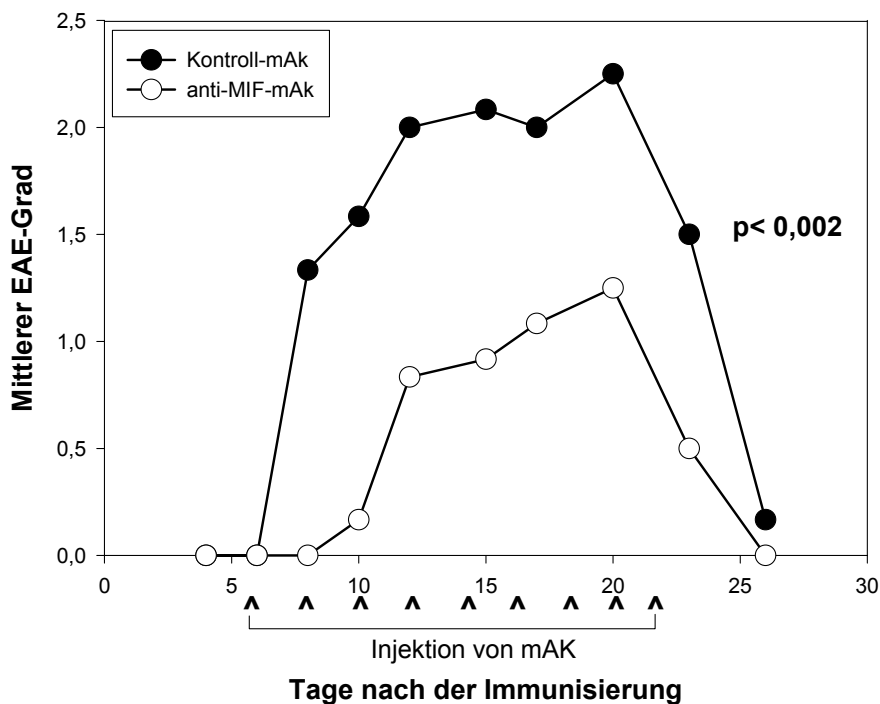


Abb. 13 Anti-MIF-mAK wirkt unabhängig von Mausstamm und Neuroantigen

Zwanzig C57BL/6-Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen wurden mit MOGp35-55 in CFA und PT injiziert (siehe Kapitel 2.1). Ab Tag sechs wurde eine Gruppe mit anti-MIF-mAK (weißen Punkte) behandelt. Der anderen Gruppe wurde Kontroll-mAK injiziert (schwarze Punkte). Gezeigt sind die durchschnittlichen klinischen EAE-Grade für ein repräsentatives Experiment. Der p-Wert wurde aus dem mittleren EAE-Grad aller Mäuse beider Gruppen zu mehreren Zeitpunkten nach Injektion des jeweiligen Antikörpers über die Dauer des Krankheitsschubs errechnet. Das Experiment wurde zwei Mal mit gleichem Ergebnis wiederholt.

Die Resultate zeigen, dass die Neutralisierung von MIF positive Effekte auf den Krankheitsverlauf hat, und dass diese Effekte unabhängig von Mausstamm und Neuroantigen sind. Damit hat eine Therapie mit anti-MIF-mAK entscheidende Vorteile gegenüber einer Therapie mit "Altered Peptide Ligands" (14, 29, 56, 124), die eine Protektion nur für ein bestimmtes Peptid erreicht. Dieser Vorteil kann für eine Anwendung am Menschen, wo sich die Immunantwort wahrscheinlich gegen mehrere Neuroantigene (u.a. MBP, PLP, MOG, MAG) (123) richtet, von entscheidender Bedeutung sein.

Zusammenfassend kann nach den bisherigen Experimenten gesagt werden, dass anti-MIF-mAK-Behandlung unabhängig von Neuroantigen und Mausstamm den Krankheitsverlauf von EAE abmildert, die Dauer eines Krankheitsschubs verkürzt und die Anzahl an entzündlichen CD4⁺-T-Zell-Infiltraten im ZNS vermindert. Als ursächlicher Mechanismus für die verringerte Zellinfiltration ins Gehirn wird im Folgenden die Migration der enzephalitogenen T-Zellen ins Gehirn untersucht.

4.5 Adhäsionsmoleküle und T-Zell-Migration ins ZNS

Die Wanderung von enzephalitogenen T-Zellen ins Gehirn ist abhängig von der Interaktion von Adhäsionsmolekülen, wie dem VLA-4 auf T-Zellen mit VCAM-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen (44, 122).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Behandlung mit anti-MIF-mAK in Mäusen mit einer Veränderung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen, VCAM-1 und/oder ICAM-1, assoziiert werden kann. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Abnahme in der Expression von VCAM-1 auf der Oberfläche des zerebralen Endothels in anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen verglichen mit Kontroll-mAK-behandelten Mäusen (Abb. 14A, graue Balken versus schwarze Balken; $p < 0,01$; Abb. 14B, linke untere Abbildung versus linke obere Abbildung). Im Gegensatz dazu ist die ICAM-1-Expression nicht verändert (Abb. 14A, graue Balken versus schwarze Balken; $p > 0,05$; Abb. 14B rechte untere Abbildung versus rechte obere Abbildung). Gleiche Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn C57BL/6 Mäuse mit dem MOGp35-55-Peptid immunisiert und ab Tag sechs behandelt wurden oder die Behandlung mit Antikörper erst ab Tag elf begonnen wurde.

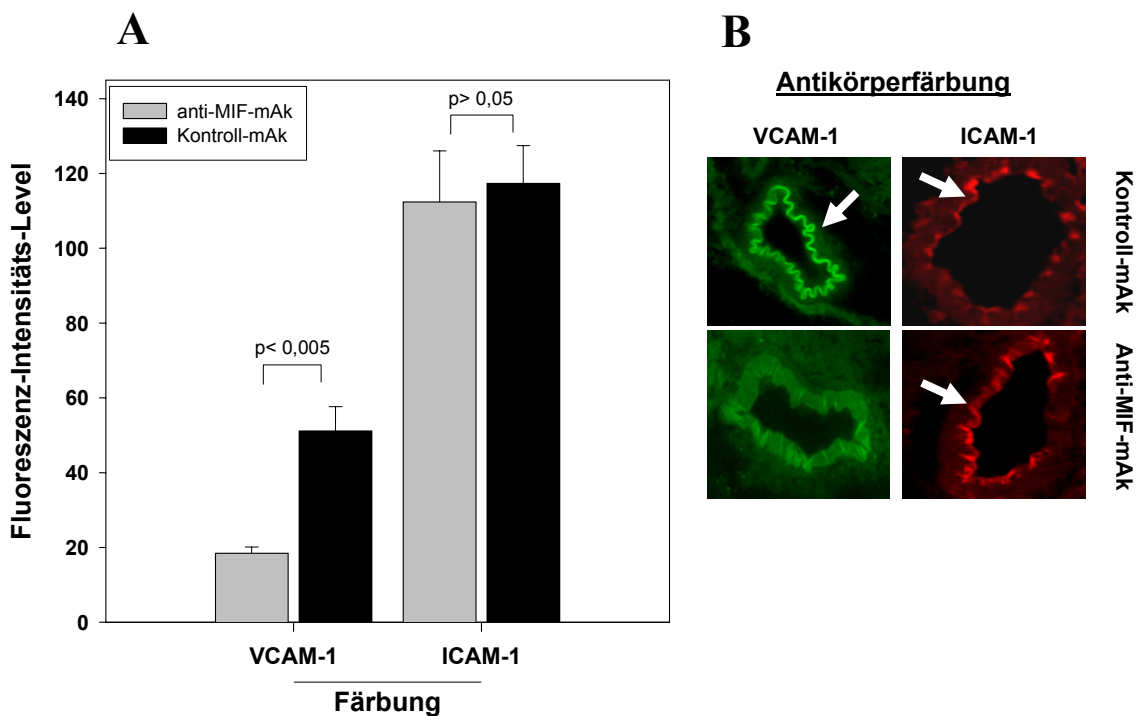


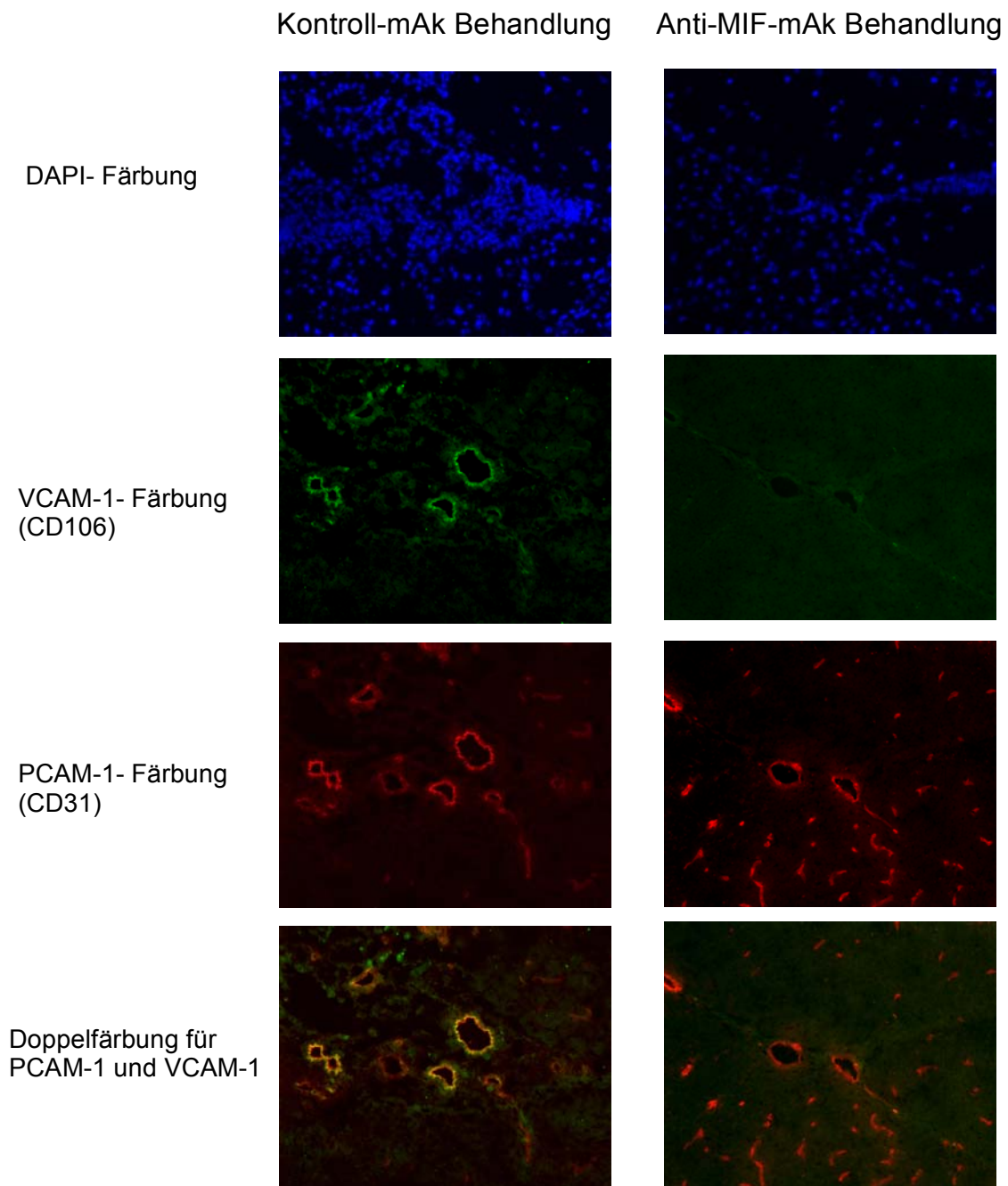
Abb.14 Anti-MIF-mAK vermindert die VCAM-1 Expression im ZNS

Zwanzig SJL/J-Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen wurden, wie im Kapitel 2.1 beschrieben, immunisiert und ab Tag sechs mit Antikörpern behandelt. Von repräsentativen Mäusen wurden Gehirn-Schnitte in unterschiedlichen Niveaus der Neuraxis angefertigt und mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern (FITC-VCAM-1 und PE-ICAM-1) angefärbt. Die Fluoreszenz-Intensität wurde mit Hilfe von Adobe-Photoshop bestimmt (siehe Kapitel 2.9) und über mehrere Mäuse und mehrere Schnitte pro Maus aus verschiedenen Hirnregionen gemittelt. Die Pfeile weisen auf die Färbung für VCAM-1 und ICAM-1 entlang des Endothels hin. Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

Um sicher zu gehen, dass in den Experimenten die VCAM-1-Expression auf Gefäßen untersucht wurde, die tatsächlich von einem Zellinfiltrat umgeben sind, wurde zusätzlich eine DAPI-Färbung angewendet, die AT-reiche Regionen von doppelsträngiger DNA anfärbt und dadurch Ansammlungen von Zellen sichtbar macht. Außerdem sollte ausgeschlossen werden, dass VCAM-1 auf Nicht-Endothel-Zellen (zum Beispiel: auf glattem Gefäßmuskel) angefärbt wurde. Dafür wurde eine Doppelfärbung mit dem Endothel-Oberflächenmolekül PCAM-1 angewendet (Abb. 15).

Abb. 15

In der DAPI-Färbung zeigen sich die Kernansammlungen (nach Abb. 9C und 9F hauptsächlich CD4⁺-T-Zellen) um die Gefäße. Außerdem wurde mit FITC die VCAM-1-Expression angefärbt, um noch einmal den Unterschied zwischen Kontroll- und anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen herauszustellen. Die PE-Färbung zeigt die Expression von PCAM-1. Die letzte Reihe stellt eine Doppelfärbung für VCAM-1 und PCAM-1 dar, wodurch deutlich wird, dass es sich bei dem angefärbten VCAM-1 eindeutig um VCAM-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen handelt.



Die Ergebnisse bestätigen bereits veröffentlichte Daten von Lan et al. (76), die einen herabregulierenden Effekt einer MIF-Blockade auf die Expression von VCAM-1 gezeigt haben. Diese verminderte Expression von VCAM-1 kann für die reduzierte Anzahl an pathogenen T-Zellen im ZNS verantwortlich sein. Zusätzlich kommen aber andere Mechanismen in Frage, welche die Migration beeinflussen können, wie zum Beispiel eine verminderte Chemokin-Produktion und/oder Chemokin-Rezeptor-Expression. Dies wurde im vorliegenden Modell nicht untersucht.

4.6 Anti-MIF-mAK-Wirkung auf spezifische T-Zellen

Die bisher gezeigten Daten deuten darauf hin, dass die anti-MIF-mAK-Behandlung das "Homing" von pathogenen T-Zellen ins ZNS beeinträchtigt. Es könnte sich bei diesen Zellen aber nicht nur um pathogene PLPp139-151-spezifische T-Zellen, sondern auch um "Bystander"-T-Zellen handeln. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Anzahl und die Zytokin-Expression von PLPp139-151-reaktiven T-Zellen im ZNS mit Hilfe des ELISPOT bestimmt. Der Computer-unterstützte ELISPOT ermöglicht die Zytokinbestimmung mit einer Einzelzellauflösung und ist daher besonders für diese Fragestellung geeignet (siehe Kapitel 2.3).

In Abb. 16A sind die Ergebnisse von PLPp139-151-immunisierten SJL-Mäusen gezeigt, denen ab Tag elf entweder anti-MIF-mAK (Abb. 16A, graue Balken) oder Kontroll-mAK (Abb. 16A, schwarze Balken) injiziert wurde. Nach drei Wochen wurden die Leukozyten des Rückenmarks entnommen und ein ELISPOT durchgeführt.

Interessanterweise ist die Anzahl von PLPp139-151-reaktiven IFN- γ -produzierenden T-Zellen im ZNS von anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen deutlich verringert. Die Behandlung hat aber nicht das "Priming" der T-Zellen verhindert, da PLPp139-151-reaktive T-Zellen in der Milz nachgewiesen werden konnten (Abb. 16B). Außerdem konnte keine verstärkte Produktion von IL-5 (Abb. 16A & B), IL-4 (gestestet mit ELISPOT) oder IL-10 (getestet mit ELISA) festgestellt werden, was gegen die Entwicklung einer protektiven PLPp139-151-spezifischen Th2-Immunantwort im Sinne einer Immundeprivation spricht. TNF α war nicht zu detektieren.

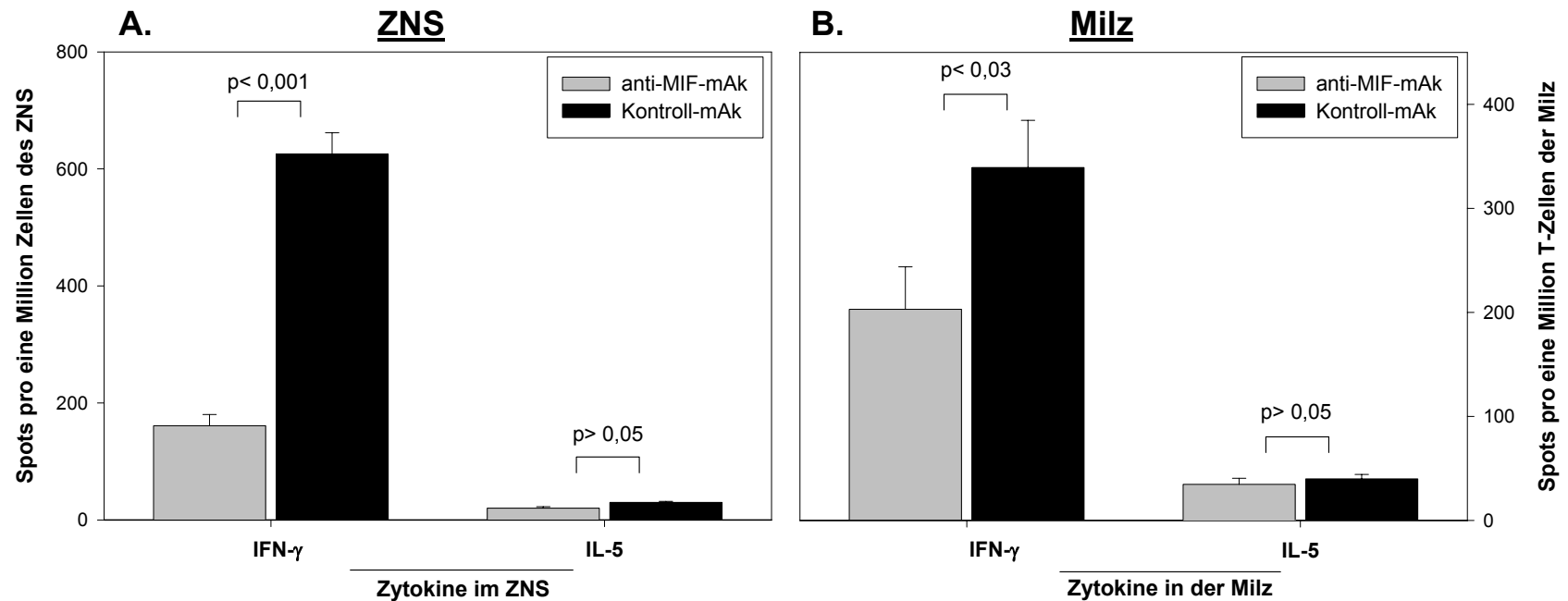


Abb. 16 Anti-MIF-mAK vermindert die Zahl an Neuroantigen-reaktiven Th1-Zellen im ZNS

SJL/J-Mäuse wurden mit PLPp139-151 in CFA/PT immunisiert. Am Tag elf wurden die Mäuse randomisiert und in zwei Gruppen eingeteilt, wobei eine Gruppe mit anti-MIF-mAK behandelt wurde, die andere mit Kontroll-mAK. Nach drei Wochen wurde die Anzahl der PLPp139-151-spezifischen IFN- γ - und IL-5-produzierenden Zellen bestimmt. Dargestellt ist die Anzahl der Zytokin-produzierenden Zellen pro eine Million Zellen im ZNS (Abb. 16A) beziehungsweise pro eine Million T-Zellen in der Milz (Abb. 16B). Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten unter anderem zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Immunisierung bestätigt. Die Injektion mit Antikörpern bereits von Tag sechs an ergab vergleichbare Ergebnisse.

Die Daten zeigen, dass eine Behandlung mit anti-MIF-mAK das ‐Homing‐ von PLPp139-151-spezifischen, pathogenen T-Zellen beeinflusst. Drei unabhängige Versuche, sowohl für eine Behandlung ab Tag sechs als auch für eine Behandlung ab Tag elf, bestätigten jeweils die Ergebnisse, unter anderem zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Immunisierung und mit separierten CD4⁺-T-Zellen.

Eine Untersuchung auf ‐Epitope spreading‐, das heißt, ob reaktive IFN- γ -produzierende T-Zellen nicht nur gegen das Immunisierungsantigen, sondern auch gegen andere Neuroantigene im Verlauf der Erkrankung zu detektieren sind, war sowohl für anti-MIF-mAK- als auch für Kontroll-mAK-behandelte Mäuse negativ. Untersucht wurden die Antigene PLPp178-191 und MLPp84-109. Dies widerspricht den Daten der Arbeitsgruppe um V. Tuohy, die ‐Epitope spreading‐ in SJL-Mäusen auf oben genannte Antigene nachweisen konnten (132, 133, 145).

4.7 Pathogenität der neuroantigen-spezifischen T-Zellen

Um die Pathogenität der PLPp139-151-spezifischen T-Zellen nach einer Behandlung mit anti-MIF-mAK direkt untersuchen zu können, wurde ein adoptiver Transfer mit Milzzellen von (B) anti-MIF- oder (A) Kontroll-mAK-behandelten Mäusen durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass die gleiche Anzahl an PLPp139-151-reaktiven T-Zellen von beiden Gruppen transferiert wird, wurde die Zahl der aktivierten antigen-spezifischen T-Zellen, die von den Spendermäusen gewonnen wurde, mit Hilfe eines IL-2-ELISPOTs parallel zur Restimulierung über vier Tage bestimmt. Dadurch konnte die Gesamtzahl an PLPp139-151-reaktiven T-Zellen in der Kultur berechnet und gleiche Zahlen von aktivierten T-Zellen aus beiden Gruppen in naive SJL-Empfängermäuse transferiert werden (siehe Kapitel 2.5).

In Abb. 17A ist die Entwicklung der Mäuse dargestellt, in die Zellen aus Kontroll-Mäusen transferiert wurden, während den Mäusen, dargestellt in Abb. 17B, Zellen aus anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen injiziert wurden.

Interessanterweise zeigt sich eine verminderte Enzephalitogenität der Zellen aus anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen, was sich in einer deutlich schwächeren Ausprägung von EAE (Abb. 17B) ausdrückt. Der pathogene Effekt der transferierten Zellen titriert sich in beiden Gruppen mit der abnehmenden Anzahl an injizierten PLPp139-151-spezifischen, IL-2-produzierenden T-

Zellen aus. Das bestätigt, dass das T-Zell-Kompartiment durch die Behandlung mit anti-MIF-mAK verändert wird. Dass zusätzlich auch andere Zellen, zum Beispiel die APZ, durch die Behandlung in ihrer Wirkung verändert werden, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

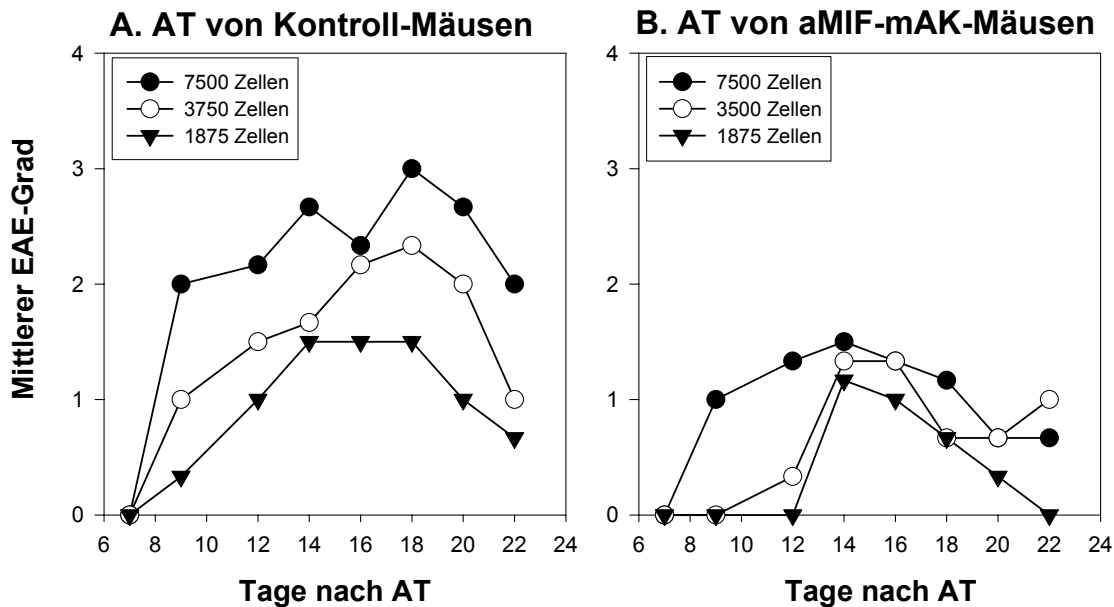


Abb. 17 Anti-MIF-mAK reduziert die Pathogenität von spezifischen T-Zellen

Zwanzig SJL/J-Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen wurden, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, immunisiert und ab Tag sechs jeden zweiten Tag mit Antikörper behandelt. Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Milzzellen entnommen, *in vitro* mit dem Immunisierungsantigen noch einmal restimuliert und dann in naive SJL-Mäuse injiziert. Ein Zytokin-ELISPOT wurde parallel zur *in-vitro*-Stimulation durchgeführt, um die Anzahl der PLPp139-151-spezifischen, aktivierten T-Zellen zu bestimmen (siehe Kapitel 2.5). Die Anzahl der injizierten T-Zellen wurde entsprechend der Anzahl der IL-2-produzierenden PLPp139-151-spezifischen T-Zellen angepasst. Dabei wurden zunächst drei Mäuse pro Gruppe mit 7500 IL-2-produzierenden Zellen pro Maus injiziert (A & B, schwarze Punkte). Bei den weiteren Gruppen wurde eine Titration über zwei Stufen durchgeführt. Abb. 17A zeigt den mittleren EAE-Grad von Mäusen, denen Kontroll-mAK injiziert wurden. Abb. 17B demonstriert die Ergebnisse von Mäusen, die anti-MIF-mAK erhalten haben. Das Experiment wurde zweimal mit gleichen Resultaten wiederholt.

4.8 Aktivierungsschwelle von spezifischen T-Zellen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von EAE mit anti-MIF-mAK den Krankheitsverlauf bessert und die Anzahl der

PLPp139-151-reaktiven T-Zellen im ZNS und in der Milz vermindert. Zusätzlich kann natürlich auch die Funktion dieser Zellen eingeschränkt sein.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde 25 Tage nach der Immunisierung die Zytokinproduktion von PLPp139-151-spezifischen T-Zellen aus anti-MIF-mAK- oder Kontroll-mAK-behandelten SJL-Mäusen als Funktion der Antigenkonzentration, die zur Restimulation verwendet wurde, in einem IFN- γ -ELISPOT getestet. Das Antigen wurde über eine Spanne von 100 μ g/ml bis 0,001 μ g/ml austitriert.

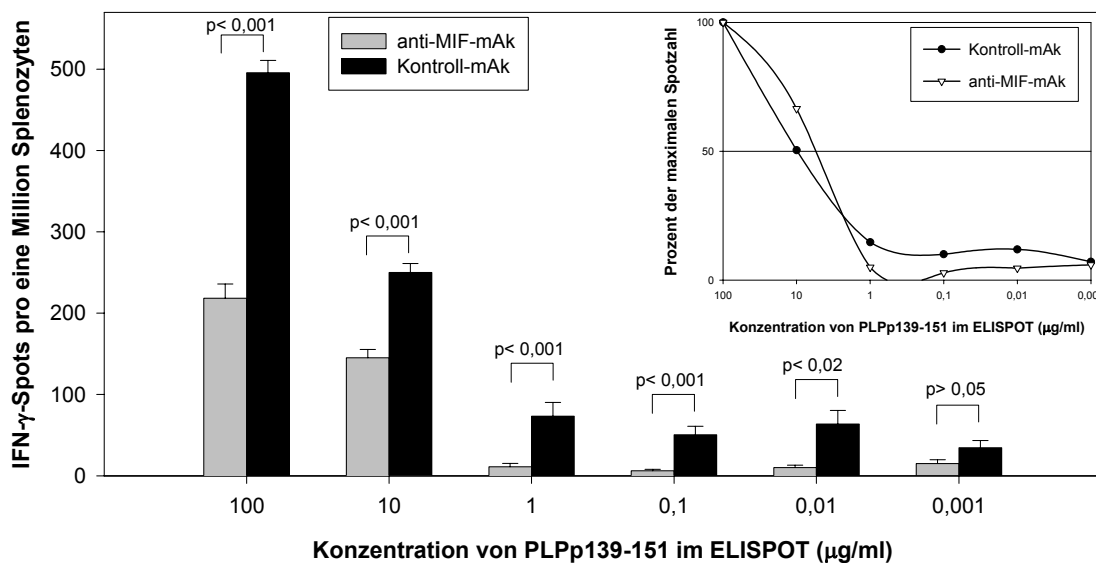


Abb. 18 Anti-MIF-mAK erhöht die Aktivierungsschwelle von Splenozyten

Zwölf SJL/J-Mäuse im Alter von etwa sechs bis acht Wochen wurden mit PLPp139-151 in CFA und PT immunisiert. Die Mäuse wurden randomisiert und in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe wurde ab Tag sechs mit anti-MIF-mAK (graue Balken) behandelt, die andere erhielt Kontroll-mAK (schwarze Balken). Die Anzahl an PLPp139-151-reaktiven, IFN- γ -produzierenden T-Zellen im ZNS wurde drei Wochen nach der Immunisierung mit dem Zytokin-ELISPOT-Assay bestimmt. Dabei wurde das Antigen, das zur Restimulation verwendet wurde, über eine Spanne von 100 μ g/ml bis 0,001 μ g/ml austitriert. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aller IFN- γ -produzierenden Zellen pro eine Million Milzzellen für eine Gruppe von sechs Mäusen. Die Resultate wurden in drei unabhängigen Experimenten mit zwölf bis zwanzig Mäusen pro Experiment wiederholt. In der kleinen Abbildung werden die Werte als Prozentanteil der maximal erreichten Spotzahl wiedergegeben.

Die Daten in Abb. 18 illustrieren, dass Leukozyten von anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen (schwarze Balken) 10- bis 100-fach höhere Antigenkonzentrationen zur Stimulierung benötigen, um vergleichbare Spotzahlen im ELISPOT zu erreichen, wie Zellen aus Kontroll-Mäusen (graue Balken).

Der gleiche Versuch wurde im Folgenden mit purifizierten CD4⁺-T-Zellen durchgeführt (Abb. 19) und ergab die gleichen Resultate wie die vorangegangene Versuchsreihe. Dies bestätigt noch einmal, dass die gewonnenen Ergebnisse vor allem auf ein verändertes T-Zell-Kompartiment zurückzuführen sind.

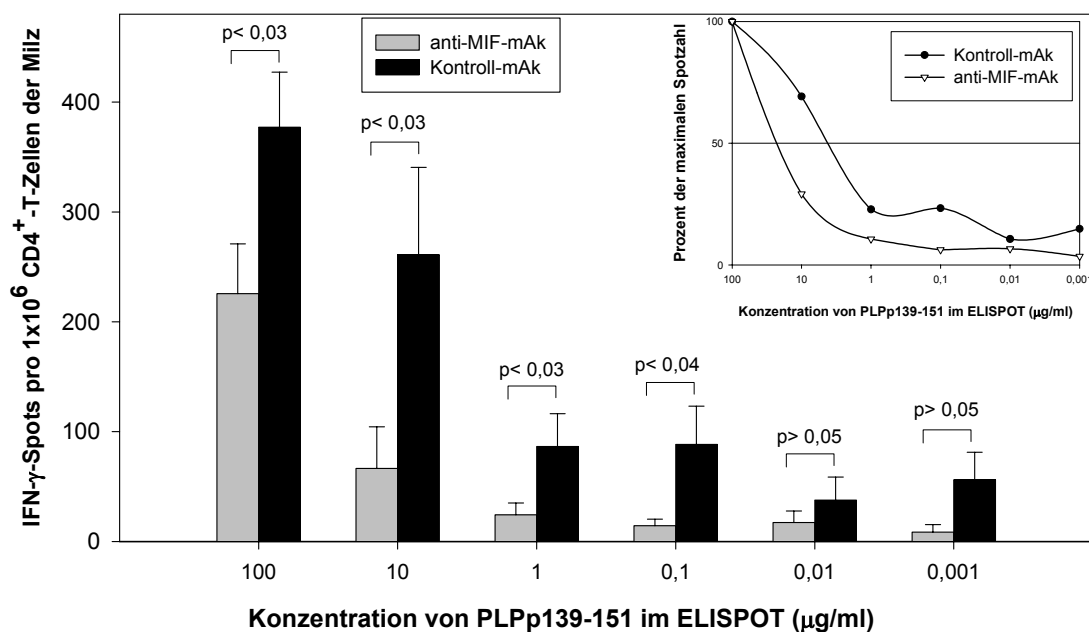


Abb. 19 Anti-MIF-mAK erhöht die Aktivierungsschwelle von T-Zellen (Milz)

Im gleichen Versuchsaufbau wie im vorherigen Experiment wurden CD4⁺-T-Zellen aus dem Zellhomogenat der Milz mittels Antikörper-beschichteter Säulen der Firma „Research Diagnostics“ extrahiert und mit durch Bestrahlung inaktivierten APZs aus einer naiven Maus getestet. Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

Weiterhin galt es zu klären, ob dieses Phänomen auch bei den ins Gehirn eingewanderten T-Zellen zu beobachten ist. Dazu wurden Mäuse immunisiert (siehe Kapitel 2.1) und mit Kontroll- oder anti-MIF-mAK behandelt (Abb. 20). Wie schon für die Splenozyten beziehungsweise die separierten CD4⁺-T-Zellen der Milz gezeigt, war auch in diesem Versuch ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Populationen festzustellen. Die PLPp139-151-reaktiven Zellen aus anti-MIF-mAK-behandelten

Mäusen benötigten, im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen, eine deutlich höhere Antigenkonzentration, um eine vergleichbare Zytokinproduktion zu erreichen.

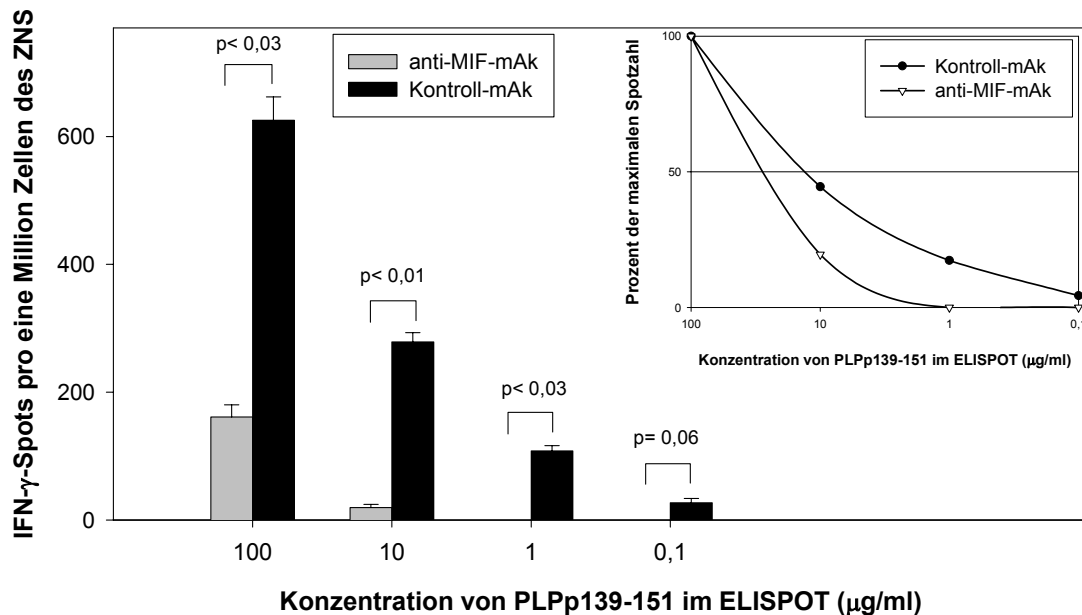


Abb. 20 Anti-MIF-mAK erhöht die Aktivierungsschwelle von Zellen im ZNS

Zwanzig SJL/J-Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen wurden, wie in Kapitel .1 beschrieben, immunisiert und ab Tag elf mit Antikörper behandelt. Fünfzehn Tage nach der Immunisierung und nach drei Antikörper-Injektionen wurden die Mäuse getötet und die Leukozyten des Rückenmarks gewonnen. Eine Separierung von CD4⁺-T-Zellen war in diesem Versuchsaufbau nicht möglich, da nur wenige Zellen aus dem Rückenmark extrahiert werden konnten. Die Zellen wurden im ELISPOT mit einer Konzentration des Antigens von 100 bis 0,1 µg/ml getestet. Das Experiment wurde dreimal mit gleichen Ergebnissen wiederholt.

In allen drei Experimenten konnten gleiche Ergebnisse unabhängig davon erzielt werden, ob die Antikörper-Behandlung an Tag sechs oder an Tag elf begonnen wurde. Aus dieser Versuchsreihe kann sowohl für das Gehirn als auch für die Milz gefolgert werden, dass die PLPp139-151-reaktiven Zellen in beiden Organen nach einer anti-MIF-mAK-Behandlung eine erhöhte Aktivierungsschwelle und damit eine geringere funktionelle Avidität besitzen. Ein Grund für die erhöhte Aktivierungsschwelle der PLPp139-151-reaktiven T-Zellen in den anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen könnte eine verstärkte und verfrühte Apoptose der funktionell hoch aviden T-Zellen sein. Um dies zu klären, wurden Experimente mit Hilfe des "TUNEL-Assays" durchgeführt.

4.9 Apoptose im T-Zell-Pool

In nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob es eventuell zu einem frühzeitigen Absterben der funktionell hoch-aviden T-Zellen im T-Zell-Repertoire der anti-MIF-mAK-behandelten Mäuse kommt. Dazu wurden SJL-Mäuse dem gleichen Immunisierungsprotokoll, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, unterzogen und von Tag sechs beziehungsweise elf an jeden zweiten Tag mit anti-MIF- oder Kontroll-mAK behandelt. Zu mehreren Zeitpunkten während des Krankheitsverlaufs wurden repräsentative Mäuse getötet und Schnitte aus verschiedenen Regionen des Gehirns entnommen. Die kryofixierten Schnitte wurden mit Hilfe der TUNEL-Technik (siehe Kapitel 2.10) gefärbt, um apoptotische Zellen im Gehirn zu erkennen. Eine zusätzliche Färbung für Oberflächenantigene (CD11b, CD19, CD4, F4/80) ermöglichte die Identifizierung der Zellart, die von der Apoptose betroffen war. Die Beurteilung durch zwei unabhängige, geblindete Untersucher ergab einen deutlichen Anstieg der Apoptoserate unter den CD4⁺-T-Zellen in beiden mit anti-MIF-mAK-behandelten Mäusegruppen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen, unabhängig vom Beginn der Therapie. Die Apoptoserate der Makrophagen und APZ war nicht beeinflusst. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist die Wirkung von MIF auf den p53-Signalweg (94). Die Neutralisierung von MIF mit Hilfe des Antikörpers hebt die Apoptoseprotektion auf. In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.8 kann dies so interpretiert werden, dass vor allem die T-Zellen des Repertoires für den selbstinduzierten Zelltod anfällig werden, die eine geringe Aktivierungsschwelle für das spezifische Antigen haben, funktionell also hoch avide sind (130, 147).

4.10 Langfristige Wirkung von anti-MIF-mAK im ZNS

Um zu untersuchen, ob das Zielorgan der Erkrankung, das Gehirn, nach einer anti-MIF-mAK-Behandlung gegen eine zweite Induktion von EAE, das heißt einen weiteren "Schub", geschützt ist, wurden SJL-Mäuse mit PLPp139-151 immunisiert (siehe Kapitel 2.1) und ab Tag sechs über zwei Wochen mit anti-MIF- oder Kontroll-mAK behandelt. Dann wurde eine Periode von 13 Tagen ohne Behandlung eingeschoben, um auszuschließen, dass noch Antikörper im Kreislauf vorhanden sind. Im Anschluss daran wurde ein zweites Mal versucht, EAE zu induzieren, dieses Mal mit Hilfe eines AT von PLPp139-151 spezifischen T-Zellen aus immunisierten, aber unbehandelten Mäusen.

In Tabelle 2 sind die Resultate aus zwei Versuchen mit jeweils acht Mäusen pro Gruppe dargestellt.

Tabelle 2 Effekte der Behandlung mit anti-MIF-Antikörper auf die Entwicklung von EAE in einem zweiten "Schub"				
Behandlung	(1) EAE-Grad	(2) EAE-Grad	(1) Überleben	(2) Überleben
Kontrolle-mAk	3,9 ± 0,4	5,0 ± 0	8/16 (50,0%)	0/16 (0%)
Anti-MIF-mAk	2,7 ± 0,3	4,75 ± 0,3	14/16 (87,5%)	1/16 (6,25%)

Die Mäuse wurden mit PLPp139-151/CFA (subkutan) und PT (ip) injiziert und geblindet nach den klinischen Symptomen beurteilt. Anti-MIF-mAK oder Kontroll-mAK wurden ab Tag sechs jeden zweiten Tag bis Tag 22 injiziert. Zwei Wochen nach der letzten AK-Injektion wurden Milzzellen von PLPp139-15/CFA-immunisierten, aber unbehandelten Mäusen injiziert. (1) Tag 22: Ende der Antikörperbehandlung; (2) Tag 42: Sechs Tage nach dem adoptiven Transfer. (Klinischer EAE-Grad: das durchschnittliche Maximum, das von den Mäusen erreicht wurde (mindestens größer/ gleich eins)).

Dieser Versuch zeigte sehr deutlich, dass die zu Beginn mit MIF behandelten Mäuse keinen dauerhaften Schutz des ZNS aufweisen und nach einer zweiten Induktion von EAE sich im Krankheitsverlauf an die Kontroll-Mäuse angleichen (Tabelle 2). Auch in der Letalität zeigt sich, nach der zweiten Induktion von EAE, kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Kontroll- und Experimentalgruppe.

Eine anti-MIF-mAK-Behandlung kann folglich nicht einmalig sein, sondern muss, vergleichbar den Glukokortikoiden, in jedem Schub neu verabreicht werden. Dies ist nachvollziehbar, bedenkt man die kontinuierliche Produktion von MIF in diversen Körperzellen.

4.11 T-Zellen und andere MIF-sezernierende Zellen

Hat der anti-MIF-mAK auch dann einen Effekt, wenn er nur auf bereits aktivierte T-Zellen und auf nicht-T-Zell-sezerniertes MIF wirkt? Um diese Frage zu beantworten, wurde ein umgekehrter AT durchgeführt. Dazu wurden neuroantigen-spezifische T-Zellen in Mäuse transferiert, die zuvor drei Mal mit anti-MIF- oder Kontroll-mAK behandelt worden waren. Abb. 21 zeigt ein repräsentatives Experiment.

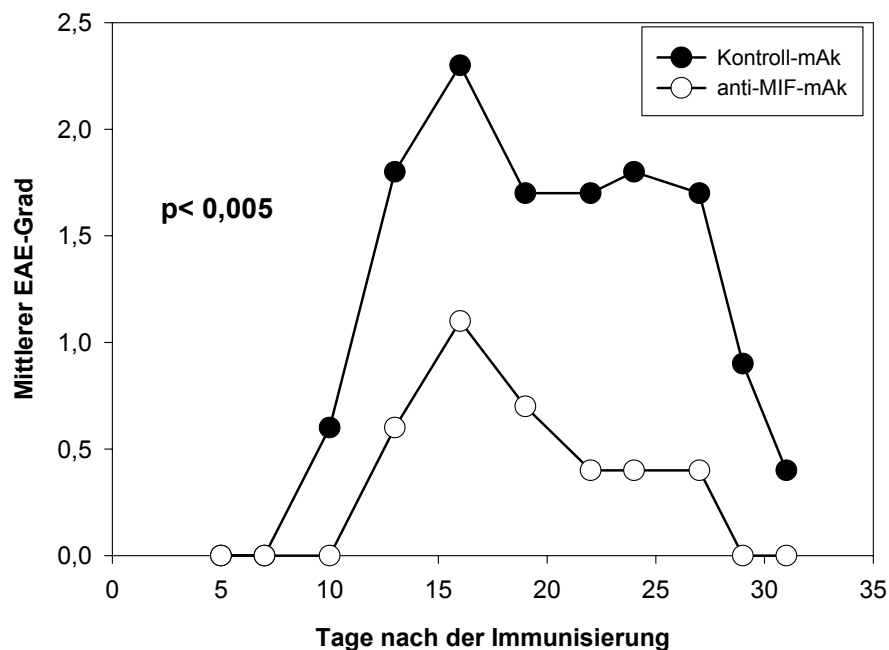


Abb. 21 Anti-MIF-mAK wirkt auf die Effektorphase von T-Zellen

Zehn naive Mäuse pro Gruppe wurden über fünf Tage jeden zweiten Tag entweder mit anti-MIF-mAK oder mit Kontroll-mAK behandelt. Parallel dazu wurden 30 Mäuse mit PLPp139-151 in CFA immunisiert. Nach zehn Tagen wurden die immunisierten Mäuse splenektomiert und die Milzzellen restimuliert. Nach vier Tagen Restimulation wurden die Zellen gepoolt und jeweils Zellsuspensionen mit gleicher Zellzahl in die mit Antikörper vorbehandelten Mäuse, zwei Tage nach der letzten Antikörpergabe, injiziert. Die Mäuse wurden dann auf die Entwicklung von EAE hin beobachtet. Der p-Wert wurde aus dem mittleren EAE-Grad aller Mäuse beider Gruppen zu mehreren Zeitpunkten nach Injektion der restimulierten Milzzellen bis zum Ende des Krankheitsschubs errechnet. Das Experiment wurde viermal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in den Mäusen, die mit anti-MIF-mAK behandelt wurden, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Der Beginn der Erkrankung war verzögert, und der klinische EAE-Grad war signifikant vermindert ($p < 0,005$).

Dieses Experiment lässt darauf schließen, dass die zweite Phase der T-Zell-Aktivierung durch die Behandlung mit anti-MIF-mAK verändert ist. Der Einfluss des Antikörpers auf das „Priming“ der T-Zellen scheint nur von untergeordneter Bedeutung für die Krankheitsentwicklung zu sein. Außerdem besteht der Effekt der anti-MIF-mAK-Behandlung nur temporär. Ein Aussetzen der Antikörperinjektion macht die Mäuse

wieder anfällig für EAE nach einem AT von PLPp139-151-spezifischen T-Zellen aus immunisierten, aber unbehandelten Mäusen, wie in Kapitel 4.10 gezeigt.

Natürlich kann auch ein Einfluss des Antikörpers auf Nicht-T-Zellen die Ursache für die Beobachtung in diesem Experiment sein. Nachdem MIF von vielen Zellen des Körpers produziert wird, unter anderem von Zellen, die Einfluss auf die Immunantwort haben, wie der Mikroglia, ist wahrscheinlich, dass auch in diesen Zellen Veränderungen durch die Injektion des Antikörpers entstehen, die den Krankheitsverlauf modulieren. Dass das T-Zell-Kompartiment aber von entscheidender Bedeutung ist, zeigen die Versuche zum AT (Kapitel 4.7) sowie zur erhöhten Aktivierungsschwelle der T-Zellen in anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen (Kapitel 4.8).

Im Gegensatz dazu steht das Ergebnis aus einem weiteren Versuch (Abb. 22). In diesem Experiment wurden Mäuse mit PLPp139-151 in CFA/PT immunisiert. Die Injektion von Kontroll- oder anti-MIF-mAK wurde aber bereits einen Tag vor der Immunisierung begonnen und bis Tag 13 fortgesetzt. Das heißt, auch hier wurde „prophylaktisch“ eine Therapie verabreicht, ähnlich wie in dem umgekehrten AT. Anders als in den Ergebnissen aus Kapitel 4.1, in denen ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Experimentalgruppe festgestellt werden konnte, nachdem die Antikörper-Behandlung entweder an Tag sechs oder an Tag elf begonnen wurden, zeigte sich in diesem Experiment zwar auch ein Unterschied zwischen beiden Gruppen, dieser war aber nicht signifikant ($p=0,14$). Eine Gabe von anti-MIF-mAK scheint also keine oder nur eine geringere Wirkung zu haben, wenn sie „prophylaktisch“, vor der Induktion der akuten Erkrankung, verabreicht wird.

Zu vermuten ist, dass das „Priming“ der T-Zellen durch die Immunisierung mit Hilfe des CFA in eine Sättigung kommt, in der anti-MIF-mAK in der frühen Phase nur wenig Wirkung zeigen. Außerdem ist in diesem Versuchsaufbau der Antikörper wahrscheinlich nicht lange genug im Organismus anwesend, um einen Einfluss auf die Effektorphase der T-Zellen zu haben.

Alternativ wäre denkbar, dass das Immunsystem sich an die Blockade des MIF adaptiert und andere Zytokine und Chemokine verstärkt sezerniert werden. Getestet wurde in diesem Experiment auf IFN- γ und IL-5, wobei die Daten ähnliche Ergebnisse zeigten wie im Versuch in Abb. 16 (Kapitel 4.6) beschrieben. Das heißt, es könnten andere Zytokine und Chemokine kompensatorisch erhöht sein. Zu denken wäre zum Beispiel

an IL-12, IL-6, IL-8, TNF α , MCP-1. Für diese wurde im vorliegenden Experiment aber nicht getestet.

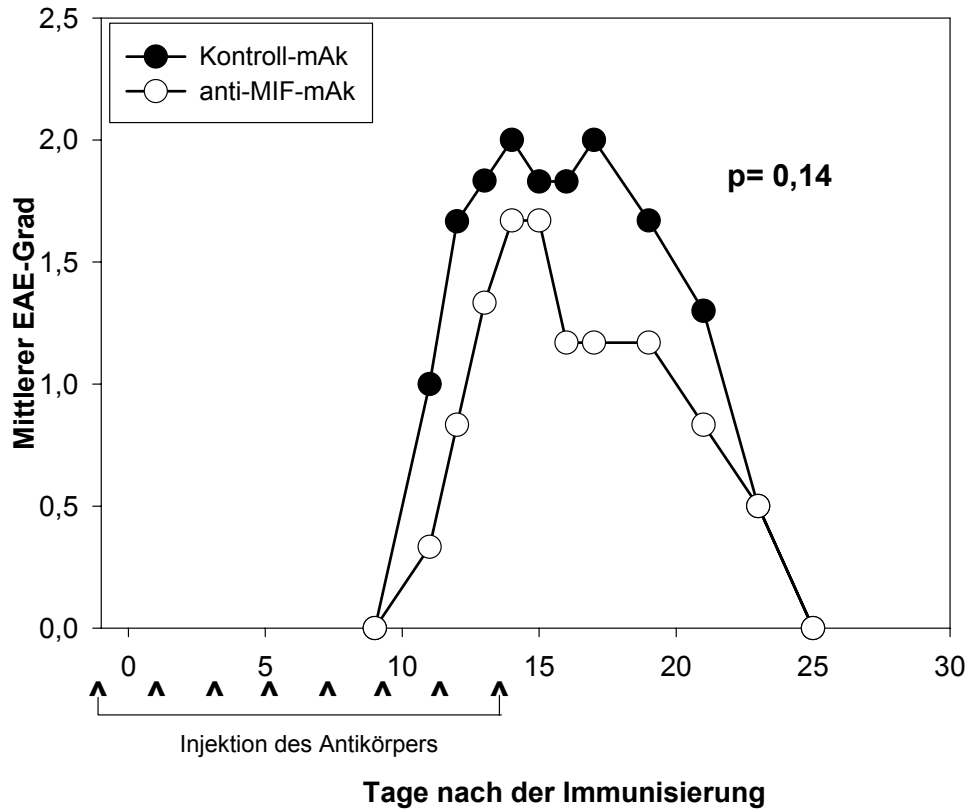


Abb. 22 Anti-MIF-mAK hat keine „prophylaktische“ Wirkung

Zwanzig SJL/J-Mäuse wurden randomisiert und in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe wurde vom Tag vor der Immunisierung an jeden zweiten Tag bis Tag 13 mit anti-MIF-mAK behandelt. Die andere Gruppe erhielt Kontroll-mAK. An Tag null wurden alle Mäuse mit PLPp139-151 in CFA und PT immunisiert. Die Mäuse wurden dann auf ihren Krankheitsverlauf hin beobachtet. Das Experiment wurde zweimal mit gleichen Ergebnissen durchgeführt.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal beschrieben, dass die präventive und therapeutische Gabe von anti-MIF-mAK in der akuten EAE hoch wirksam ist. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Blockade von MIF die Migration der neuroreaktiven T-Zellen zum ZNS beeinträchtigt. Die Anzahl der T-Zellen im Gehirn ist verringert und die Zellen zeigen ein geringeres pathogenes Potential sowie eine erhöhte Aktivierungsschwelle und Apoptoserate. Obwohl MIF in der akuten Phase und bei Gabe vor Ausbruch der Symptome wirkt, scheint es keine dauerhafte Protektion des Zielorgans zu erreichen. Eine zweite Induktion von EAE nach Absetzen der Antikörperbehandlung führt zu gleichen Ausprägungsgraden der Erkrankung wie in den Kontroll-Mäusen. Eine vakzinierende Wirkung scheint ebenfalls nicht zu bestehen.

5.1 MIF und Adhäsionsmoleküle

Die Wanderung autoreaktiver T-Zellen an Stellen der Entzündung ist entscheidend von der Interaktion der Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der T-Zellen, VLA-4 und LFA-1, mit ihren Liganden, VCAM-1 und ICAM-1, auf den Endothelzellen des Zielgewebes abhängig (18, 26, 50).

Der verzögerte Beginn der Erkrankung und die verringerte Schwere der Ausprägung von EAE in Mäusen nach anti-MIF-mAK-Behandlung kann im vorliegenden Modell als Folge der verminderten Expression von VCAM-1 im ZNS und damit der verringerten T-Zell-Infiltration gesehen werden. Diese Interpretation deckt sich mit Berichten aus einem Glomerulonephritis-Modell in Ratten, in dem die Behandlung mit anti-MIF-mAK ebenfalls die vermehrte Expression von VCAM-1 im Bereich der Entzündung verhindert (76). Außerdem haben Studien in verschiedenen Modellen (18, 62, 131) direkt den Liganden von VCAM-1 auf den T-Zellen, VLA-4, mit der Migration von neuroantigen-spezifischen T-Zellen ins Gehirn und der EAE-Symptomatik in Verbindung gebracht. Analog dazu spricht die in den USA neu zugelassene Therapie für die schubförmig-remittierende MS mit Natalizumab, einem alpha4-Integrin-Antagonisten des VLA-4, für die Bedeutung der VLA-4/VCAM-1-Interaktion in der Pathogenese der MS (105). Antikörper gegen VLA-4 im EAE-Modell, vor dem Beginn der Erkrankung gegeben, sind in der Lage, die Erkrankung in Mäusen vollständig zu verhindern oder zumindest abzuschwächen (131). Wird der Antikörper gegeben, wenn

die Krankheit bereits voll ausgeprägt ist, sieht man eine Verstärkung der Symptome und eine erhöhte Akkumulation von T-Zellen im Gehirn. Als Ursache für die Verschlechterung der Symptomatik vermutet man die vermehrte Aktivierung von Th1-Zellen und eine verstärkte Produktion von IFN- γ und IL-2 (131).

Diese Beobachtungen stehen allerdings im Gegensatz zu den Resultaten in der vorliegenden Arbeit, die sehr deutlich demonstrieren, dass eine Behandlung mit anti-MIF-mAK gerade auch dann effektiv ist, wenn die Symptome bereits vorhanden sind. Man muss deshalb davon ausgehen, dass der Effekt von anti-MIF-mAK nicht nur über eine verminderte Expression von VCAM-1 zu erklären ist. Es können zum Beispiel auch die T-Zellen oder andere Zellpopulationen, die in der Pathogenese involviert sind, durch die Behandlung verändert sein. Zu diesen Zellpopulationen gehören unter anderem die Mikroglia-Zellen und Oligodendrozyten ebenso wie die APZ. Die MIF-Blockade könnte außerdem die Expression von den Chemokinen verändern, die an der Regulation der T-Zell-Rekrutierung zu Entzündungsstellen beteiligt sind, wie etwa MIP-1 α oder MCP-1. Die wichtige Rolle dieser Chemokine in der Pathogenese von EAE wurde von Karpus et al. (59) demonstriert. Wie MIF im Zusammenspiel mit diesen Chemokinen wirkt, ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Zusätzlich könnten auch Modifikationen der Effektorfunktionen von Makrophagen/Mikroglia und/oder T-Zellen auftreten.

5.2 MIF und T-Zellen

Um der Frage nachzugehen, inwieweit das T-Zell-Kompartiment durch eine Behandlung mit MIF verändert wird, wurden weitere Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl an PLPp139-151-reaktiven IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen in immunisierten und mit anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen vermindert ist. Nachdem MIF beim „Priming“ und der Aktivierung von T-Zellen (5) mitbeteiligt ist, kann die verminderte Zahl der Effektor- und Memory-Zellen durch eine eingeschränkte Aktivierung der naiven T-Zellen bedingt sein. Die Tatsache, dass die verminderte Zahl an T-Zellen aber dann detektiert wurde, wenn die Behandlung mit dem Antikörper an Tag sechs oder elf begonnen wurde, spricht gegen diese Annahme, nachdem zu dem Zeitpunkt der Antikörperinjektion die PLPp139-151-spezifischen T-Zellen bereits aktiviert sein müssten. Die Beobachtung, dass eine prophylaktische Gabe

von anti-MIF-mAK (am Tag vor der Immunisierung) den Verlauf der EAE nur geringfügig bessert, spricht außerdem dafür, dass ein beeinträchtigtes „Priming“ der T-Zellen zwar eventuell mitverantwortlich für den beobachteten Effekt ist, diesen aber nicht vollständig erklären kann. Die Beeinträchtigung des „Priming“ kann also zu einer verminderten Zahl an neuroantigen-spezifischen T-Zellen führen, sie erklärt die Beobachtung aber nicht ausreichend.

Die MIF-Blockade kann natürlich auch die PLPp139-151-spezifischen T-Zellen, besonders im ZNS, in der Effektor-Phase beeinflusst haben, wie dies durch den Versuch des umgekehrten AT unterstützt wird (Abb. 21). Dies könnte dadurch geschehen, dass die verminderte Expression von VCAM-1 im ZNS die Migration dieser autoreaktiven Zellen ins ZNS-Parenchym verhindert. Durch die ausbleibende Migration ins ZNS-Parenchym könnte es den autoreaktiven T-Zellen an Stimulationssignalen fehlen, die über den TZR vermittelt werden und für die Aktivierung und das Überleben der Zellen notwendig sind (28, 112, 137). Diese fehlenden Interaktionen machen die Zellen anfällig für apoptotische Signale. Auch VLA-4, der Ligand von VCAM-1, wurde als wichtiges kostimulatorisches Signal entdeckt (31, 32), das unter anderem T-Zellen vor der Apoptose schützt (147). Aus diesen Erkenntnissen kann geschlossen werden, dass die verminderte Expression von VCAM-1 zu einer verstärkten T-Zell-Apoptose beitragen kann. Dies unterstützt die Beobachtung im vorliegenden Modell, die eine erhöhte Apoptoserate nach der Behandlung mit anti-MIF-mAK zeigt.

Auch die signifikante Erhöhung der Aktivierungsschwelle der PLPp139-151-spezifischen T-Zellen in anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen (siehe Abb. 18, 19, 20) kann durch die Apoptose von funktionell hoch aviden neuroantigen-spezifischen T-Zellen erklärt werden (130). Alternativ können die PLPp139-151-spezifischen T-Zellen in diesem Modell anerg oder nicht in der Lage sein, ausreichend über kostimulatorische Moleküle, wie CD40-CD40L oder CD28-CD80/86, Signale zu vermitteln. Es wurde bereits in früheren Publikationen gezeigt (121, 134), dass MIF auf die Expression von CD40-CD40L beziehungsweise CD28-CD80/86 wirkt, und diese Wirkung außerdem konzentrationsabhängig ist. Über eine verminderte Expression von B7-1 (CD80) auf B-Zellen wirkt auch das in der Klinik therapeutisch angewandte IFN- β 1b.

Außerdem wurde eine Beteiligung von MIF an der Regulation der MHC-II-Moleküle dokumentiert (88, 121). Eine Behandlung mit anti-MIF-mAK führt demnach zu einer

verminderten Expression von MHC-II auf der Oberfläche von Immunzellen (88, 121), was eine verminderte Signalgebung über den TZR und damit eine verminderte Aktivierung der T-Zellen bedeutet.

Auch die APZ können in ihrer Funktion beeinträchtigt sein. Die Tatsache aber, dass $CD4^+$ -T-Zellen, ebenso wie unseparierte Leukozyten aus der Milz (Abb. 18), 10- bis 100-fach höhere Antigenkonzentrationen benötigen, wenn sie mit naiven APZ (nicht Antikörper-behandelt) im ELISPOT restimuliert werden (Abb. 19), deutet darauf hin, dass vor allem das T-Zell-Kompartiment verändert ist.

5.3 MIF und Zytokine

Nachdem die regulatorischen T-Zellen durch eine potentielle Kontrollfunktion bei Autoimmunkrankheiten wieder in das Blickfeld der Wissenschaft rücken, war auch im vorliegenden Modell die Frage nach der Rolle dieser Zellen zu stellen.

Bewirkt die Blockade von MIF eine Verschiebung der T-Zell-Antwort in Richtung protektiver Th2-Zytokine, wie es in anderen Modellen, zum Beispiel nach einer Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen B7-1, beschrieben wurde (70)? Diese Frage kann mit „Nein“ beantwortet werden. Weder IL-5 (Abb. 16), IL-4 noch IL-10 waren im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen verändert. Die so genannte protektive Th2-Verschiebung blieb aus. Die Blockade von MIF scheint also nicht eine Hochregulation von Th2-Zytokinen zu bewirken, sondern eine Herunterregulation von Th1-Zytokinen, wie im Versuch zur Abb. 16 bestätigt. Unterstützt werden diese Beobachtungen durch die Arbeit von Kitaichi et al. (66), die aufzeigt, dass eine Behandlung von verschiedenen T-Zell-Untergruppen mit anti-MIF-mAK in vitro vor allem auf die IFN- γ -produzierende Gruppe hemmend wirkt. Diese Hemmung scheint über eine spezifische Blockade des TZR vermittelt zu sein.

Zu erwarten wäre außerdem eine verminderte Produktion von $TNF\alpha$ nach einer Applikation von anti-MIF-mAK, wie dies in mehreren Publikationen beschrieben wurde (23, 33, 103) und auch durch die Wirkung von MIF auf den TLR-4 abzuleiten wäre. Im untersuchten Modell ist $TNF\alpha$ allerdings in so geringen Mengen vorhanden, dass mit der herkömmlichen Methode des ELISAs (Sensitivität etwa 0,1pg/ml) keine Unterschiede festzustellen waren. Eine entscheidende Bedeutung von $TNF\alpha$, wie sie für die rheumatoide Arthritis beschrieben wurde und auch bereits mit Antikörpern gegen

TNF α in der Therapie (Wirkstoff: Infliximab) umgesetzt wird, konnte im Mausmodell der EAE bisher nicht gezeigt werden. Für die MS ist diese Aussage nicht so eindeutig zu treffen, da in MS-Patienten erhöhte TNF α -Werte gefunden wurden, und TNF α auch als wichtiger prognostischer Faktor gilt (64). Ein Therapieversuch mit anti-TNF α -mAK wurde bisher noch nicht angestrebt.

Obwohl im vorliegenden Modell nicht auf die Produktion von TGF- β durch regulatorische CD25⁺-T-Zellen (93) getestet wurde, weisen die Ergebnisse des Versuchs, der in Abb. 17 illustriert ist, darauf hin, dass transferierte T-Zellen von immunisierten und anti-MIF-mAK-behandelten Mäusen nicht protektiv sind. Die naiven Empfänger-Mäuse zeigen nach dem Transfer der restimulierten Zellen eine typische EAE-Symptomatik. Viel eher in das Gesamtbild der Ergebnisse passt die Erklärung, dass durch die Blockade von MIF in der Behandlung von EAE die Th1-Antwort im Gesamten herabreguliert wird.

5.4 MIF und Glukokortikoide

MIF und die Glukokortikoide sind in einem streng regulierten Gleichgewicht miteinander verknüpft (siehe Abb. 4; 19, 21). Glukokortikoide bewirken eine Ausschüttung von MIF, während MIF der Glukokortikoid-induzierten Sekretionshemmung von inflammatorischen Zytokinen in Makrophagen, synovialen Fibroblasten und T-Zellen entgegenwirkt und zu einer Erhöhung von TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 (22, 79), IFN- γ und IL-2 (5) führt. Wie diese gegenseitige Regulation auf molekularer Ebene funktioniert, wird noch diskutiert.

Einen Ansatzpunkt bietet die Regulation der p44/p42-ERK-Subfamilie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) in Fibroblasten, die nach einer MIF-Stimulation in ihrer Aktivität erhöht ist. Die Signalkaskade der ERK-MAPK resultiert in der Aktivierung einer Reihe von zytoplasmatischen Proteinen, wie zum Beispiel der Phospholipase A₂ (cPLA₂). cPLA₂ ist auch ein Zielprotein der Glukokortikoide. Die Aktivierung des Proteins durch MIF kann ein Mechanismus sein, mittels dessen das Chemokin den Glukokortikoiden entgegenwirkt (95).

MIF scheint außerdem eine wichtige Rolle bei der Regulation der p53-abhängigen Apoptose zu spielen (51, 95). Das Chemokin führt in dem Modell von Mitchell et al. (95) zu einer verminderten Produktion von p53 und damit zu einem Apoptoseschutz in

den Leukozyten. Die erhöhte MIF-Konzentration ist direkt korreliert mit einer erhöhten Konzentration von Cyclooxygenase II (COX II) und cPLA₂. Eine Applikation von anti-MIF-mAK kehrt das Verhältnis von COX II, cPLA₂ zu p53 um und vermindert dadurch die Zahl an Leukozyten, die in die Apoptose gehen. Im Gegensatz dazu konnte außerdem eine erhöhte Rate an NO-vermittelter Apoptose festgestellt werden, die ebenfalls einer MIF-Wirkung zugeschrieben wird. MIF nimmt also einen fein gesteuerten Einfluss auf die Apoptose, der mit multiplen Rückkoppelungsmechanismen reguliert wird. Insgesamt scheint aber der Apoptoseschutz durch MIF zu überwiegen. Dies bestätigen auch die Experimente im vorliegenden Modell. Die Behandlung mit anti-MIF-mAK führt zu einer erhöhten Zahl an apoptotischen CD4⁺-T-Zellen im Gehirn, wie in Kapitel 4.9 beschrieben.

Ein anderer Mechanismus, durch den MIF die Entzündungsreaktion beeinflussen und den Glukokortikoiden entgegenwirken könnte, ist der Effekt auf NF-κB. NF-κB ist ein wichtiger Regulator der Genexpression von inflammatorischen Zytokinen (7) und der Expression von Oberflächenmolekülen auf Endothelien (129). Glukokortikoide hemmen die Wirkung von NF-κB (2), MIF fördert sie (34). Eine Behandlung mit anti-MIF-mAK kann also nicht nur das proinflammatorische Zytokin MIF hemmen, sondern auch, vermittelt durch eine verminderte NF-κB-Freisetzung aus dem NF-κB/IκB-Komplex, die Expression vieler anderer inflammatorischer Zytokine, wie TNFα, IL-1β oder IL-8 senken (21). Ob TNFα im vorliegenden Modell vermindert war, kann nicht gesagt werden, da die Mengen zu gering waren, um Unterschiede feststellen zu können. Auf Veränderungen in der Konzentration von IL-1β oder IL-8 wurde nicht getestet.

Die Ergebnisse der Gruppe um T. Calandra (114) zeigen, dass die Wirkung von MIF sowohl auf die NF-κB-Aktivität als auch auf die Produktion von TNFα über den Toll-Rezeptor 4 (TLR4) vermittelt ist und zwar über eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors PU.1, der für die optimale Expression des TLR4-Gens in myeloiden Zellen notwendig ist. Damit kommt MIF auch eine wichtige Rolle im Rahmen der angeborenen Immunität zu. Eine Bedeutung der Behandlung mit anti-MIF-mAK auf die Infektabwehr müsste in weiteren Experimenten geklärt werden. Studien bei Leishmania-major-Infektionen haben gezeigt, dass MIF einen protektiven Effekt hat (143). Bei Infektionen mit dem japanischen Enzephalitis-Virus (128), beim „Toxic-Shock-Syndrom“ (24) und bei Sepsis (12, 17, 23, 114) durch gram-negative Keime

scheint MIF zur Pathogenese beizutragen, während eine Behandlung mit anti-MIF-mAK protektiv wirkt. Die Rolle von MIF bei Infektionen ist also noch nicht abschließend geklärt und bedarf genauerer Untersuchungen, bevor MIF im Rahmen einer Phase-1-Studie eingesetzt werden könnte.

An der Pathogenese der MS (41) und EAE (63, 109) sind außerdem die MMP beteiligt. MMP werden von Entzündungszellen und Mikrogliazellen ausgeschüttet und sind bei MS-Patienten erhöht (41). Sie zerstören die Basalmembran der Blut-Hirn-Schranke und erleichtern dadurch die Extravasation der Entzündungszellen. Außerdem spalten und aktivieren sie membrangebundene Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und schädigen direkt die Myelinscheide (63). MIF ist in der Lage, die Expression von MMP zu induzieren (106), während Glukokortikoide die MMP-Konzentration vermindern. Die Therapie mit anti-MIF-mAK wirkt also auch an diesem Punkt der Pathogenese. Anti-MIF-mAK verhindern die den Glukokortikoiden entgegengesetzte Wirkung von MIF und bewirken damit eine verminderte Expression von MMP: Die direkte Schädigung der Myelinscheide ist eingeschränkt, die Infiltration von Entzündungszellen vermindert. Die geringere Zahl an CD4^+ -T-Zellen (Abb. 12) nach anti-MIF-mAK-Behandlung kann folglich nicht nur durch eine verminderte Expression von VCAM-1 (Abb. 14) auf dem Endothel im Gehirn bedingt sein, sondern auch durch die herabgesetzte MMP-Konzentration, die der Blut-Hirn-Schranke nur wenig anhaben kann. Unter anderem über eine Hemmung der MMP-Expression scheint auch die Therapie mit IFN- β 1b zu wirken (83). Möglicherweise greift anti-MIF-mAK an einem gleichen Mechanismus an wie das erwiesenermaßen wirksame IFN- β 1b.

Ein interessanter Versuch, um den Zusammenhang zwischen den Glukokortikoiden und der anti-MIF-mAK-Behandlung aufzuklären, wäre eine Behandlung mit Antikörpern gegen MIF und gegen Glukokortikoide gleichzeitig nach Immunisierung mit PLPp139-151/CFA. Dieser Versuch könnte eventuell darüber Aufschluss geben, welche der Effekte der anti-MIF-mAK-Behandlung tatsächlich durch die Glukokortikoide vermittelt sind und welche unabhängig von den Glukokortikoiden zustande kommen. Zu vermuten ist, dass ein Teil der protektiven Wirkungen des anti-MIF-mAK durch die Blockade der Glukokortikoide wegfällt, dass aber weitere Wirkungswege existieren, die ebenfalls auf den Krankheitsprozess Einfluss nehmen und so die Unterschiede der anti-MIF-mAK-Therapie zur Glukokortikoid-Stoßtherapie erklären.

In einem der EAE ähnlichen Modell, bei Neuritiden (experimentelle autoimmune Neuritis), werden Glukokortikoide in Hochdosis gegeben und unterdrücken zwar erwiesenermaßen die Entzündung, führen aber zu einer verstärkten Defektheilung. Das heißt, es gehen mehr Zellen zugrunde als dies ohne die entzündungshemmende Medikation der Fall gewesen wäre, wodurch die Langzeitergebnisse eventuell negativ beeinflusst werden. Es wäre deshalb auch hier interessant zu untersuchen, wie die Langzeitergebnisse einer anti-MIF-mAK-Therapie alleine und eventuell auch kombiniert mit einer Glukokortikoid-Therapie aussehen würden. Kann die anti-MIF-mAK-Behandlung auf Dauer die Prognose bessern oder vielleicht bei Kombination mit Glukokortikoiden deren negative Langzeitfolgen auf die Zellen im Entzündungsgebiet mildern?

5.5 MIF in „Priming“ und Effektorphase von T-Zellen

Bei der Gabe von anti-MIF-mAK ab dem ersten Tag vor der Immunisierung ist nur ein geringer Unterschied in der Ausprägung der Erkrankung zur Kontroll-Gruppe zu sehen (Abb. 22). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der signifikanten Besserung des Krankheitsverlaufs nach Gabe des Antikörpers ab Tag sechs beziehungsweise Tag elf. Wie ist diese Beobachtung zu erklären, wo doch die Wirkung von MIF auf das „Priming“ der T-Zellen bereits bewiesen ist (5)? Dass die Wirkung von anti-MIF-mAK nicht nur durch das eingeschränkte „Priming“ der T-Zellen zu deuten ist, wurde bereits in Kapitel 5.2 dargestellt. Wie aber erklärt sich, dass das eingeschränkte „Priming“ bei Blockade von MIF nur geringe Auswirkungen zeigt? Nach Bacher et al. (5) ist die T-Zell-Proliferation nach anti-MIF-mAK-Behandlung um 40-60% reduziert. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt der anti-MIF-mAK-Behandlung einen Tag vor Immunisierung könnte sein, dass das „Priming“ der T-Zellen durch den Zusatz von CFA bei der Immunisierung in einem Sättigungszustand ist, in dem der Antikörper keine entscheidende Wirkung zeigt. Hinzu kommt, dass der Antikörper außerdem nur bis Tag 13 injiziert wurde und deshalb vermutlich seine Wirkung auf die zweite Phase der T-Zell-Aktivierung nicht voll entfalten konnte.

Im Versuch des umgekehrten AT (Kapitel 4.11), bei dem Zellen von PLPp139-151/CFA-immunisierten Mäusen in mit anti-MIF-mAK- oder Kontroll-mAK-vorbehandelte Mäuse injiziert wurden, konnte durch die „prophylaktische“ Injektion

von anti-MIF-mAK ein signifikanter Effekt auf den Krankheitsverlauf erzielt werden. Die „Priming“-Phase der enzephalitogenen T-Zellen stand dabei nicht unter dem Einfluss von anti-MIF-mAK, da die Zellen aus immunisierten, aber unbehandelten Mäusen transferiert wurden. Wahrscheinlich aber konnte in diesem Fall der anti-MIF-mAK lange genug im Blut zirkulieren, um die Effektorphase der transferierten T-Zellen zu beeinträchtigen.

Mit dem umgekehrten AT konnte außerdem gezeigt werden, dass der Effekt des anti-MIF-mAK auf sensibilisierte T-Zellen in der Effektorphase auszureichen scheint, um einen signifikanten Unterschied im Krankheitsverlauf im Vergleich zu Kontroll-mAK-behandelten Mäusen zu verursachen (Abb. 21). Der Einfluss des anti-MIF-mAK auf das „Priming“ scheint von untergeordneter Bedeutung zu sein.

5.6 MIF als therapeutischer Angriffspunkt

Interessanterweise wirkt sich die Blockade von MIF unabhängig vom Neuroantigen und von der Art des Mausstamms positiv auf den Verlauf von EAE aus. Dies birgt entscheidende Vorteile gegenüber manch anderen Therapiestrategien, bei denen die genaue Kenntnis des Antigens, gegen das sich die T-Zell-Antwort hauptsächlich richtet, notwendig ist. Außerdem führt die Behandlung nicht zu einer Verschiebung in Richtung der Th2-Antwort, wie es von klinischen Studien an MS-Patienten mit „Altered Peptide Ligands“ von MBP-Peptiden berichtet wurde (14, 29, 56, 124). Mit Hilfe der anti-MIF-mAK-Therapie könnte also eine selektive Inaktivierung von pathogenen autoreaktiven T-Zellen erreicht werden. Dies ist seit Jahren das ultimative Ziel der spezifischen Immuntherapie.

Glukokortikoide sind potente therapeutische Mittel, aber ihr Einsatz in der Klinik ist durch ihre dosisabhängigen Nebenwirkungen limitiert. MIF ist wahrscheinlich ein Faktor, der die immunosuppressive Wirkung von Glukokortikoiden einschränkt. Die Resistenz gegenüber Glukokortikoiden in der Therapie von Autoimmunerkrankungen beim Menschen wird zunehmend mit einer erhöhten AP-1- und NF- κ B-Aktivität assoziiert (6). MIF greift ebenfalls an den AP-1 und NF- κ B- Signalwegen an (13, 34, 67, 114, 121). Die Blockade von MIF könnte folglich den anti-inflammatorischen Effekt der Glukokortikoide verstärken und damit die nötige Dosis der Glukokortikoide reduzieren. Dies kann vor allem bei Glukokortikoid-Resistenz beziehungsweise bei

Limitationen der Glukokortikoid-Therapie wegen starker Nebenwirkungen vor allem in chronisch-entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen wichtig werden.

Als therapeutische Agenzien besitzen blockierende Antikörper eine eingeschränkte Wirksamkeit, da sie immunogen sind und deshalb nach und nach von körpereigenen Antikörpern neutralisiert werden. Für die Blockade von MIF kommen aber auch kleinmolekulare Stoffe in Frage, wobei dafür vor allem die enzymatischen Eigenschaften von MIF eine wichtige Rolle spielen. Es wäre zum Beispiel denkbar, ein Substrat herzustellen, das von MIF enzymatisch verändert wird, dann kovalent an das MIF-Molekül bindet und so die Aktivität von MIF inhibiert. Versuche, die in diese Richtung gehen, wurden bereits angestellt (36, 86, 119). Interessanterweise konnte dabei festgestellt werden, dass ein Substrat der Tautomerase-Aktivität von MIF große Ähnlichkeit mit dem Schmerzmittel Paracetamol besitzt. Dies hat zur Hypothese geführt, dass MIF einen Baustein in dem noch unklaren Wirkmechanismus von Paracetamol darstellt (119). Diverse Pharmafirmen (zum Beispiel IDEC und Avanir Pharmaceuticals) verfolgen unterschiedliche Strategien zur Herstellung von Reagenzien zur Blockade von MIF (15).

Die zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie aller bisherigen Publikationen zu diesem Thema lässt den begründeten Schluss zu, dass mit anti-MIF-mAK oder anderen MIF-blockierenden Substanzen ein neuer Weg in der Multiple-Sklerose-Therapie eingeschlagen werden kann.

6 Zusammenfassung

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (MIF) ist ein Chemokin, das eine wichtige Rolle bei der Regulation der Effektorfunktionen von Makrophagen und bei der T-Zell-Aktivierung und -Migration innehat. Untersuchungen zur Bedeutung des Chemokins in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis, wurden bereits durchgeführt und finden ihre Umsetzung in klinischen Studien zu einem möglichen neuen Therapieansatz.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die Rolle von MIF in der Pathogenese der EAE aufzuklären und dadurch eventuell neue Aspekte der bislang nur unvollständig verstandenen Krankheitsmechanismen aufzudecken. Außerdem soll eine Aussage darüber getroffen werden, ob anti-MIF-mAK als Therapie für die EAE und damit möglicherweise auch für die MS in Frage kommt.

Es konnte demonstriert werden, dass die Behandlung mit anti-MIF-mAK von PLP₁₃₉₋₁₅₁-induzierter EAE in SJL-Mäusen in der akuten Phase der Erkrankung wirkt und zu einer schnelleren Besserung im Vergleich zu Kontroll-Mäusen führt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das „Homing“ der pathogenen Neuroantigen-spezifischen T-Zellen in das ZNS durch die anti-MIF-mAK-Behandlung eingeschränkt ist. Als ein möglicher Mechanismus konnte die verminderte Expression von VCAM-1 auf der Oberfläche der Endothelzellen im Gehirn ausgemacht werden. Zusätzlich reduzierte die MIF-Blockade die klonale Expansion und die Pathogenität der Neuroantigen-reaktiven CD4⁺-T-Zellen. Weitere Experimente führten zu der Annahme, dass eine verminderte Zahl an funktionell hoch aviden T-Zellen, wahrscheinlich aufgrund erhöhter Apoptose, die eingeschränkte Pathogenität des T-Zell-Pools bedingt. Interessanterweise sind diese Ergebnisse unabhängig vom Mausstamm und vom Neuroantigen, mit dem immunisiert wurde.

Zusammengefasst kann man daraus ableiten, dass die Blockade von MIF einen vielversprechenden neuen Ansatz in der Therapie der MS begründen könnte.

III. Literatur

1. **Abe R, Peng T, Sailors J, Bucala R, Metz CN.** Regulation of the CTL Response by Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Journal of Immunology* 2001; 166:747-53.
2. **Auphan N.** Immunosuppression by Glucocorticoids: Inhibition of Nf-Kappa B Activity through Induction of I Kappa B Synthesis. *Science* 1995; 270:286-90.
3. **Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, et al.** MIF Expression in the Rat Brain: Implications for Neuronal Function. *Molecular Medicine* 1998; 4:217-30.
4. **Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, et al.** Migration Inhibitory Factor Expression in Experimentally Induced Endotoxemia. *American Journal of Pathology* 1997; 150:235-46.
5. **Bacher M, Metz CN, Calandra T, et al.** An Essential Regulatory Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor in T-Cell Activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93:7849-54.
6. **Bantel H, Schmitz ML, Raible A, Gregor M, Schulze-Osthoff K.** Critical Role of Nf-Kappa b and Stress-Activated Protein Kinases in Steroid Unresponsiveness. *FASEB Journal* 2002; 16:1832-4.
7. **Barnes PJ, Karin M.** Nuclear Factor-Kappa b: A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *New England Journal of Medicine* 1997; 336:1066-71.
8. **Barton A, Lamb R, Symmons D, et al.** Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Gene Polymorphism Is Associated with Susceptibility to but Not Severity of Inflammatory Polyarthritis. *Genes and Immunity* 2003; 4:487-491.
9. **Beishuizen A, Thijs LG, Haanen C, Vermes I.** Macrophage Migration Inhibitory Factor and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Function During Critical Illness. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001; 86:2811-6.
10. **Benigni F, Atsumi T, Calandra T, et al.** The Proinflammatory Mediator Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces Glucose Catabolism in Muscle. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 106:1291-300.

11. **Bernhagen J, Calandra T, Bucala R.** Regulation of the Immune Response by Macrophage Migration Inhibitory Factor: Biological and Structural Features. *Journal of Molecular Medicine* 1998; 76:151-61.
12. **Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, et al.** MIF Is a Pituitary-Derived Cytokine That Potentiates Lethal Endotoxaemia. *Nature* 1993; 365:756-9.
13. **Bernhagen J, Mitchell RA, Calandra T, Voelter W, Cerami A, Bucala R.** Purification, Bioactivity, and Secondary Structure Analysis of Mouse and Human Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *Biochemistry* 1994; 33:14144-55.
14. **Bielekova B, Goodwin B, Richert N, et al.** Encephalitogenic Potential of the Myelin Basic Protein Peptide (Amino Acids 83-99) in Multiple Sclerosis: Results of a Phase II Clinical Trial with an Altered Peptide Ligand. *Nature Medicine* 2000; 6:1167-75.
15. **BiotechJournal.** Antibody Therapeutics: Idec Pharmaceuticals Uses Antibodies to Treat Diseases. *BiotechJournal* 2002; July/August.
16. **Bloom B, Bennett B.** Mechanisms of a Reaction in Vitro Associated with Delayed-Type-Hypersensitivity. *Science*. 153 1966; 153:80-82.
17. **Bozza M, Satoskar AR, Lin G, et al.** Targeted Disruption of Migration Inhibitory Factor Gene Reveals Its Critical Role in Sepsis. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 189:341-6.
18. **Brocke S, Piercy C, Steinman L, Weissman IL, Veromaa T.** Antibodies to CD44 and Integrin Alpha4, but Not L-Selectin, Prevent Central Nervous System Inflammation and Experimental Encephalomyelitis by Blocking Secondary Leukocyte Recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96:6896-901.
19. **Bucala R.** MIF Rediscovered: Cytokine, Pituitary Hormone, and Glucocorticoid-Induced Regulator of the Immune Response. *FASEB Journal* 1996; 10:1607-13.
20. **Calabresi PA, Wilterdink JL, Rogg JM, Mills P, Webb A, Whartenby KA.** An Open-Label Trial of Combination Therapy with Interferon Beta-1a and Oral Methotrexate in MS. *Neurology* 2002; 58:314-7.
21. **Calandra T, Bernhagen J, Metz CN.** MIF as a Glucocorticoid-Induced Modulator of Cytokine Production. *Nature* 1995; 377:68-71.

22. **Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R.** The Macrophage is an Important and Previously Unrecognized Source of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Journal of Experimental Medicine* 1994; 179:1895-902.
23. **Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, et al.** Protection from Septic Shock by Neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Nature Medicine* 2000; 6:164-70.
24. **Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R.** Macrophage Migration Inhibitory Factor Is a Critical Mediator of the Activation of Immune Cells by Exotoxins of Gram-Positive Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95:11383-8.
25. **Cannella B, Raine CS.** The Adhesion Molecule and Cytokine Profile of Multiple Sclerosis Lesions. *Annals of Neurology* 1995; 37:424-35.
26. **Carrithers MD.** Differential Adhesion Molecule Requirements for Immune Surveillance and Inflammatory Recruitment. *Brain* 2000; 123:1092-1101.
27. **Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R.** An Essential Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Angiogenesis and the Growth of a Murine Lymphoma. *Molecular Medicine* 1999; 5:181-91.
28. **Collette Y, Razanajaona D, Ghiotto M, Olive D.** CD28 Can Promote T Cell Survival through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Independent Mechanism. *European Journal of Immunology* 1997; 27:3283-9.
29. **Conlon P, Steinman L.** Altered Peptide Ligands and MS Treatment. *Science* 2002; 296:1801-2.
30. **Dal Canto MC, Melvold RW, Kim BS, Miller SD.** Two Models of Multiple Sclerosis: Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) and Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV) Infection. A Pathological and Immunological Comparison. *Microscopy Research and Technique* 1995; 32:215-29.
31. **Damle NK, Aruffo A.** Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Induces T-Cell Antigen Receptor-Dependent Activation of CD4+T Lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88:6403-7.

32. **Damle NK, Klussman K, Leytze G, et al.** Costimulation Via Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Induces in T Cells Increased Responsiveness to the CD28 Counter-Receptor B7. *Cellular Immunology* 1993; 148:144-56.
33. **Das UN.** Critical Advances in Septicemia and Septic Shock. *Critical Care* 2000; 4:290-6.
34. **Daun JM, Cannon JG.** Macrophage Migration Inhibitory Factor Antagonizes Hydrocortisone-Induced Increases in Cytosolic I kappa b alpha. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2000; 279:R1043-9.
35. **David J.** Delayed-Type-Hypersensitivity in Vitro: Its Mediation by Cell-Free Substances Formed by Lymphoid Cell-Antigen Interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1966; 56:72-77.
36. **Dios A, Mitchell RA, Aljabari B, et al.** Inhibition of MIF Bioactivity by Rational Design of Pharmacological Inhibitors of MIF Tautomerase Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002; 45:2410-6.
37. **Echtenacher B, Falk W, Mannel DN, Krammer PH.** Requirement of Endogenous Tumor Necrosis Factor/Cachectin for Recovery from Experimental Peritonitis. *Journal of Immunology* 1990; 145:3762-6.
38. **Fujinami RS, Oldstone MB.** Amino Acid Homology between the Encephalitogenic Site of Myelin Basic Protein and Virus: Mechanism for Autoimmunity. *Science* 1985; 230:1043-5.
39. **Galat A, Riviere S, Bouet F, Menez A.** A Diversified Family of 12-KDa Proteins with a High Amino Acid Sequence Similarity to Macrophage Migration-Inhibitory Factor (MIF). *European Journal of Biochemistry* 1994; 224:417-21.
40. **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA.** Identification of Programmed Cell Death in Situ Via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *Journal of Cell Biology* 1992; 119:493-501.
41. **Gijbels K, Masure S, Carton H, Opdenakker G.** Gelatinase in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Multiple Sclerosis and Other Inflammatory Neurological Disorders. *Journal of Neuroimmunology* 1992; 41:29-34.
42. **Goodin DS.** Interferon-Beta Therapy in Multiple Sclerosis: Evidence for a Clinically Relevant Dose Response. *Drugs* 2001; 61:1693-703.

43. **Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM.** Transgenic Mice That Express a Myelin Basic Protein-Specific T Cell Receptor Develop Spontaneous Autoimmunity. *Cell* 1993; 72:551-60.
44. **Greenwood J, Wang Y, Calder VL.** Lymphocyte Adhesion and Transendothelial Migration in the Central Nervous System: The Role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *Immunology* 1995; 86:408-15.
45. **Hartung HP, Gonsette R, Konig N, et al.** Mitoxantrone in Progressive Multiple Sclerosis: A Placebo-Controlled, Double-Blind, Randomised, Multicentre Trial. *Lancet* 2002; 360:2018-25.
46. **Hayakawa M, Ishida N, Takeuchi K, et al.** Arachidonic Acid-Selective Cytosolic Phospholipase A2 Is Crucial in the Cytotoxic Action of Tumor Necrosis Factor. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268:11290-5.
47. **Hermanowski-Vosatka A, Mundt SS, Ayala JM, et al.** Enzymatically Inactive Macrophage Migration Inhibitory Factor Inhibits Monocyte Chemotaxis and Random Migration. *Biochemistry* 1999; 38:12841-9.
48. **Hesse MD, Karulin AY, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M.** A T Cell Clone's Avidity Is a Function of Its Activation State. *Journal of Immunology* 2001; 167:1353-61.
49. **Honda K, Nishihira J, Nitta K, et al.** Serum Levels of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Various Types of Glomerulonephritis. *Nephron* 2000; 86:91-2.
50. **Hori J, Isobe M, Yamagami S, Tsuru T.** Acceptance of Second Corneal Allograft by Combination of Anti-VLA-4 and Anti-LFA-1 Monoclonal Antibodies in Mice. *Transplantation Proceedings* 1998; 30:200-1.
51. **Hudson JD.** A Proinflammatory Cytokine Inhibits P53 Tumor Suppressor Activity. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190:1375-82.
52. **Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J.** A Pathogenic Role for Myelin-Specific CD8(+) T Cells in a Model for Multiple Sclerosis. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194:669-76.
53. **Jung H, Kim T, Chae HZ, Kim KT, Ha H.** Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor and Thiol-Specific Antioxidant Protein Pag by Direct Interaction. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:15504-10.

54. **Juttner S, Bernhagen J, Metz CN, Rollinghoff M, Bucala R, Gessner A.** Migration Inhibitory Factor Induces Killing of Leishmania Major by Macrophages: Dependence on Reactive Nitrogen Intermediates and Endogenous TNF-Alpha. *Journal of Immunology* 1998; 161:2383-90.
55. **Kaifi JT, Diaconu E, Pearlman E.** Distinct Roles for PECAM-1, ICAM-1, and VCAM-1 in Recruitment of Neutrophils and Eosinophils to the Cornea in Ocular Onchocerciasis (River Blindness). *Journal of Immunology* 2001; 166:6795-801.
56. **Kappos L, Comi G, Panitch H, et al.** Induction of a Non-Encephalitogenic Type 2 T Helper-Cell Autoimmune Response in Multiple Sclerosis after Administration of an Altered Peptide Ligand in a Placebo-Controlled, Randomized Phase II Trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group. *Nature Medicine* 2000; 6:1176-82.
57. **Karandikar NJ, Crawford MP, Yan X, et al.** Glatiramer Acetate (Copaxone) Therapy Induces CD8(+) T Cell Responses in Patients with Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 2002; 109:641-9.
58. **Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Bluestone JA, Miller SD.** Targeting the B7/CD28:CTLA-4 Costimulatory System in CNS Autoimmune Disease. *Journal of Neuroimmunology* 1998; 89:10-8.
59. **Karpus WJ, Lukacs NW, McRae BL, Strieter RM, Kunkel SL, Miller SD.** An Important Role for the Chemokine Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha in the Pathogenesis of the T Cell-Mediated Autoimmune Disease, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 1995; 155:5003-10.
60. **Karpus WJ, Ransohoff RM.** Chemokine Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Temporal and Spatial Expression Patterns Govern Disease Pathogenesis. *Journal of Immunology* 1998; 161:2667-71.
61. **Karulin AY, Hesse MD, Tary-Lehmann M, Lehmann PV.** Single-Cytokine-Producing CD4 Memory Cells Predominate in Type 1 and Type 2 Immunity. *Journal of Immunology* 2000; 164:1862-72.
62. **Kent SJ, Karlik SJ, Cannon C, et al.** A Monoclonal Antibody to Alpha 4 Integrin Suppresses and Reverses Active Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 1995; 58:1-10.

63. **Kieseier BC, Clements JM, Gearing AJ, Hartung HP.** Matrix Metalloproteinases Exhibit Different Expression Patterns in Inflammatory Demyelinating Diseases of the Central and Peripheral Nervous System. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999; 878:567-70.
64. **Killestein J, Kalkers NF, Meilof JF, Barkhof F, van Lier RA, Polman CH.** TNFalpha Production by CD4(+) T Cells Predicts Long-Term Increase in Lesion Load on MRI in MS. *Neurology* 2001; 57:1129-31.
65. **Kitaichi N, Kotake S, Mizue Y, Matsuda H, Onoe K, Nishihira J.** Increase of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Sera of Patients with Iridocyclitis. *British Journal of Ophthalmology* 2000; 84:1423-5.
66. **Kitaichi N, Ogasawara K, Iwabuchi K, et al.** Different Influence of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Signal Transduction Pathway of Various T Cell Subsets. *Immunobiology* 2000; 201:356-67.
67. **Kleemann R, Hausser, A, Geiger, G, Mischke, R, et al.** Intracellular Action of the Cytokine MIF to Modulate AP-1 Activity and the Cell Cycle through Jab1. *Nature* 2000; 408:211-6.
68. **Kleemann R, Grell M, Mischke R, Zimmermann G, Bernhagen J.** Receptor Binding and Cellular Uptake Studies of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Use of Biologically Active Labeled MIF Derivatives. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2002; 22:351-63.
69. **Kleemann R, Kapurniotu A, Frank RW, et al.** Disulfide Analysis Reveals a Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) as Thiol-Protein Oxidoreductase. *Journal of Molecular Biology* 1998; 280:85-102.
70. **Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al.** B7-1 and B7-2 Costimulatory Molecules Activate Differentially the Th1/Th2 Developmental Pathways: Application to Autoimmune Disease Therapy. *Cell* 1995; 80:707-18.
71. **Kuchroo VK, Martin CA, Greer JM, Ju ST, Sobel RA, Dorf ME.** Cytokines and Adhesion Molecules Contribute to the Ability of Myelin Proteolipid Protein-Specific T Cell Clones to Mediate Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 1993; 151:4371-82.
72. **Kuchroo VK, Sobel RA, Yamamura T, Greenfield E, Dorf ME, Lees MB.** Induction of Experimental Allergic Encephalomyelitis by Myelin Proteolipid-

- Protein-Specific T Cell Clones and Synthetic Peptides. *Pathobiology* 1991; 59:305-12.
73. **Kurtzke JF, Hyllested K.** Multiple Sclerosis in the Faroe Islands: I. Clinical and Epidemiological Features. *Annals of Neurology* 1979; 5:6-21.
 74. **Lafaille JJ, Keere FV, Hsu AL, et al.** Myelin Basic Protein-Specific T Helper 2 (Th2) Cells Cause Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Immunodeficient Hosts Rather Than Protect Them from the Disease. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 186:307-12.
 75. **Lafaille JJ, Nagashima K, Katsuki M, Tonegawa S.** High Incidence of Spontaneous Autoimmune Encephalomyelitis in Immunodeficient Anti-Myelin Basic Protein T Cell Receptor Transgenic Mice. *Cell* 1994; 78:399-408.
 76. **Lan HY, Bacher M, Yang N, et al.** The Pathogenic Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Immunologically Induced Kidney Disease in the Rat. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 185:1455-65.
 77. **Lan HY, Mu W, Yang N, et al.** De Novo Renal Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor During the Development of Rat Crescentic Glomerulonephritis. *American Journal of Pathology* 1996; 149:1119-27.
 78. **Lee SJ, Benveniste EN.** Adhesion Molecule Expression and Regulation on Cells of the Central Nervous System. *Journal of Neuroimmunology* 1999; 98:77-88.
 79. **Leech M, Metz C, Bucala R, Morand EF.** Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor by Endogenous Glucocorticoids in Rat Adjuvant-Induced Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2000; 43:827-33.
 80. **Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE.** Spreading of T-Cell Autoimmunity to Cryptic Determinants of an Autoantigen. *Nature* 1992; 358:155-7.
 81. **Leng L, Metz CN, Fang Y, et al.** MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 197:1467-76.
 82. **Leonard JP, Waldburger KE, Schaub RG, et al.** Regulation of the Inflammatory Response in Animal Models of Multiple Sclerosis by Interleukin-12. *Critical Reviews of Immunology* 1997; 17:545-53.
 83. **Leppert D, Waubant E, Burk MR, Oksenberg JR, Hauser SL.** Interferon Beta-1b Inhibits Gelatinase Secretion and in Vitro Migration of Human T Cells: A

- Possible Mechanism for Treatment Efficacy in Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology* 1996; 40:846-52.
84. **Liao H, Bucala R, Mitchell RA.** Adhesion-Dependent Signaling by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:76-81.
 85. **Lolis E.** Glucocorticoid Counter Regulation: Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Target for Drug Discovery. *Current Opinion in Pharmacology* 2001; 1:662-8.
 86. **Lolis E, Bucala R.** Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2003; 7:153-64.
 87. **Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J, Perrin PJ, June CH, Racke MK.** Decreased Dependence of Myelin Basic Protein-Reactive T Cells on CD28-Mediated Costimulation in Multiple Sclerosis Patients. A Marker of Activated/Memory T Cells. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101:725-30.
 88. **Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W.** Regulation of MHC Class II Genes: Lessons from a Disease. *Annual Review of Immunology* 1996; 14:301-31.
 89. **Maloy KJ, Powrie F.** Regulatory T Cells in the Control of Immune Pathology. *Nature Immunology* 2001; 2:816-22.
 90. **McDonald WI, Compston A, Edan G, et al.** Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology* 2001; 50:121-7.
 91. **Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A.** A Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Peptide Induces Typical Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in H-2b Mice: Fine Specificity and T Cell Receptor V Beta Expression of Encephalitogenic T Cells. *European Journal of Immunology* 1995; 25:1951-9.
 92. **Mikulowska A, Metz CN, Bucala R, Holmdahl R.** Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Involved in the Pathogenesis of Collagen Type II-Induced Arthritis in Mice. *Journal of Immunology* 1997; 158:5514-7.
 93. **Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL.** Suppressor T Cells Generated by Oral Tolerization to Myelin Basic Protein Suppress Both in Vitro and in Vivo Immune Responses by the Release of Transforming Growth Factor

- Beta after Antigen-Specific Triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89:421-5.
94. **Mitchell RA, Liao H, Chesney J, et al.** Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Sustains Macrophage Proinflammatory Function by Inhibiting P53: Regulatory Role in the Innate Immune Response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99:345-50.
 95. **Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R.** Sustained Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Cytoplasmic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). Regulatory Role in Cell Proliferation and Glucocorticoid Action. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:18100-6.
 96. **Mokhtarian F, McFarlin DE, Raine CS.** Adoptive Transfer of Myelin Basic Protein-Sensitized T Cells Produces Chronic Relapsing Demyelinating Disease in Mice. *Nature* 1984; 309:356-8.
 97. **Morand EF, Leech M, Weedon H, Metz C, Bucala R, Smith MD.** Macrophage Migration Inhibitory Factor in Rheumatoid Arthritis: Clinical Correlations. *Rheumatology* 2002; 41:558-62.
 98. **Nathan C.** Points of Control in Inflammation. *Nature* 2002; 420:846-52.
 99. **Nathan CF, Karnovsky ML, David JR.** Alterations of Macrophage Functions by Mediators from Lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1971; 133:1356-76.
 100. **Nathan CF, Remold HG, David JR.** Characterization of a Lymphocyte Factor Which Alters Macrophage Functions. *Journal of Experimental Medicine* 1973; 137:275-90.
 101. **Nguyen MT, Lue H, Kleemann R, et al.** The Cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor Reduces Pro-Oxidative Stress-Induced Apoptosis. *Journal of Immunology* 2003; 170:3337-47.
 102. **Niino M, Ogata A, Kikuchi S, Tashiro K, Nishihira J.** Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Conventional and Optic-Spinal Forms of Multiple Sclerosis and Neuro-Behcet's Disease. *Journal of the Neurological Sciences* 2000; 179:127-31.

103. **Nishihira J, Mizue Y, Sakamoto W.** Induction of T-Kininogen and Tumor Necrosis Factor-Alpha by Macrophage Migration Inhibitory Factor in Vivo. *Seminar in Thrombosis and Hemostasis* 1999; 25:557-62.
104. **Nishino T, Bernhagen J, Shiiki H, Calandra T, Dohi K, Bucala R.** Localization of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) to Secretory Granules within the Corticotrophic and Thyrotrophic Cells of the Pituitary Gland. *Molecular Medicine* 1995; 1:781-8.
105. **O'Connor PW, Goodman A, Willmer-Hulme AJ, et al.** Randomized Multicenter Trial of Natalizumab in Acute MS Relapses: Clinical and MRI Effects. *Neurology* 2004; 62:2038-43.
106. **Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J.** Macrophage Migration Inhibitory Factor up-Regulates Expression of Matrix Metalloproteinases in Synovial Fibroblasts of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:444-50.
107. **Onodera S, Suzuki K, Matsuno T, Kaneda K, Takagi M, Nishihira J.** Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces Phagocytosis of Foreign Particles by Macrophages in Autocrine and Paracrine Fashion. *Immunology* 1997; 92:131-7.
108. **Onodera S, Tanji H, Suzuki K, et al.** High Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Synovial Tissues of Rheumatoid Joints. *Cytokine* 1999; 11:163-7.
109. **Pagenstecher A, Stalder AK, Kincaid CL, Shapiro SD, Campbell IL.** Differential Expression of Matrix Metalloproteinase and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase Genes in the Mouse Central Nervous System in Normal and Inflammatory States. *American Journal of Pathology* 1998; 152:729-41.
110. **Pelfrey CM, Rudick RA, Cotleur AC, Lee JC, Tary-Lehmann M, Lehmann PV.** Quantification of Self-Recognition in Multiple Sclerosis by Single-Cell Analysis of Cytokine Production. *Journal of Immunology* 2000; 165:1641-51.
111. **Pender MP.** Neurology. 4: Multiple Sclerosis. *Medical Journal of Australia* 2000; 172:556-62.
112. **Radvanyi LG, Shi Y, Vaziri H, et al.** CD28 Costimulation Inhibits TCR-Induced Apoptosis During a Primary T Cell Response. *Journal of Immunology* 1996; 156:1788-98.

113. **Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP.** Demyelination in Primate Autoimmune Encephalomyelitis and Acute Multiple Sclerosis Lesions: A Case for Antigen-Specific Antibody Mediation. *Annals of Neurology* 1999; 46:144-60.
114. **Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T.** MIF Regulates Innate Immune Responses through Modulation of Toll-Like Receptor 4. *Nature* 2001; 414:920-4.
115. **Rosengren E, Aman P, Thelin S, et al.** The Macrophage Migration Inhibitory Factor MIF Is a Phenylpyruvate Tautomerase. *FEBS Letters* 1997; 417:85-8.
116. **Rosengren E, Bucala R, Aman P, et al.** The Immunoregulatory Mediator Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Catalyzes a Tautomerization Reaction. *Molecular Medicine* 1996; 2:143-9.
117. **Rovaris M, Filippi M.** MR-Based Technology for in Vivo Detection, Characterization, and Quantification of Pathology of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Journal of Rehabilitation Research & Development* 2002; 39:243-59.
118. **Rudick RA.** Contemporary Immunomodulatory Therapy for Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroophthalmology* 2001; 21:284-91.
119. **Senter PD, Al-Abed Y, Metz CN, et al.** Inhibition of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Tautomerase and Biological Activities by Acetaminophen Metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99:144-9.
120. **Shimizu T, Nishihira J, Mizue Y, et al.** High Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Serum Levels Associated with Extended Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 2001; 116:989-90.
121. **Stavitsky AB, Xianli J.** In Vitro and in Vivo Regulation by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) of Expression of MHC-II, Costimulatory, Adhesion, Receptor, and Cytokine Molecules. *Cellular Immunology* 2002; 217:95-104.
122. **Steffen BJ, Butcher EC, Engelhardt B.** Evidence for Involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in Lymphocyte Interaction with Endothelium in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Central Nervous System in the SJL/J Mouse. *American Journal of Pathology* 1994; 145:189-201.
123. **Steinman L.** Multiple Sclerosis: A Coordinated Immunological Attack against Myelin in the Central Nervous System. *Cell* 1996; 85:299-302.

124. **Steinman L, Conlon P.** Antigen Specific Immunotherapy of Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical Immunology* 2001; 21:93-8.
125. **Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H.** Multiple Sclerosis: In Situ Evidence for Antibody- and Complement-Mediated Demyelination. *Annals of Neurology* 1998; 43:465-71.
126. **Sun D, Whitaker JN, Huang Z, et al.** Myelin Antigen-Specific CD8⁺ T Cells Are Encephalitogenic and Produce Severe Disease in C57BL/6 Mice. *Journal of Immunology* 2001; 166:7579-87.
127. **Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E.** Crystal Structure at 2.6-Å Resolution of Human Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93:5191-6.
128. **Suzuki T, Ogata A, Tashiro K, et al.** Japanese Encephalitis Virus up-Regulates Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) mRNA in the Mouse Brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1517:100-6.
129. **Tak PP, Firestein GS.** Nf-Kappa b: A Key Role in Inflammatory Diseases. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 107:7-11.
130. **Targoni OS, Lehmann PV.** Endogenous Myelin Basic Protein Inactivates the High Avidity T Cell Repertoire. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 187:2055-63.
131. **Theien BE, Vanderlugt CL, Eagar TN, et al.** Discordant Effects of Anti-VLA-4 Treatment before and after Onset of Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 107:995-1006.
132. **Tuohy VK, Yu M, Weinstock-Guttman B, Kinkel RP.** Diversity and Plasticity of Self Recognition During the Development of Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99:1682-90.
133. **Tuohy VK, Yu M, Yin L, Kawczak JA, Kinkel RP.** Spontaneous Regression of Primary Autoreactivity During Chronic Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 189:1033-42.
134. **Van Kooten C, Banchereau J.** CD40-CD40 Ligand: A Multifunctional Receptor-Ligand Pair. *Advances in Immunology* 1996; 61:1-77.

135. **von Knethen A, Brune B.** Cyclooxygenase-2: An Essential Regulator of NO-Mediated Apoptosis. *FASEB Journal* 1997; 11:887-95.
136. **Waeber G, Calandra T, Roduit R, et al.** Insulin Secretion Is Regulated by the Glucose-Dependent Production of Islet Beta Cell Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94:4782-7.
137. **Walker LS, Gulbranson-Judge A, Flynn S, Brocker T, Lane PJ.** Co-Stimulation and Selection for T-Cell Help for Germinal Centres: The Role of CD28 and OX40. *Immunology Today* 2000; 21:333-7.
138. **Waxman SG.** Demyelinating Diseases - New Pathological Insights, New Therapeutic Targets. *New England Journal of Medicine* 1998; 338:323-5.
139. **Weiner HL, Mackin GA, Orav EJ, et al.** Intermittent Cyclophosphamide Pulse Therapy in Progressive Multiple Sclerosis: Final Report of the Northeast Cooperative Multiple Sclerosis Treatment Group. *Neurology* 1993; 43:910-8.
140. **Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR.** Molecular Cloning of a cDNA Encoding a Human Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86:7522-6.
141. **Windhagen A, Anderson DE, Carrizosa A, Balashov K, Weiner HL, Hafler DA.** Cytokine Secretion of Myelin Basic Protein Reactive T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 1998; 91:1-9.
142. **Wucherpfennig KW, Strominger JL.** Molecular Mimicry in T Cell-Mediated Autoimmunity: Viral Peptides Activate Human T Cell Clones Specific for Myelin Basic Protein. *Cell* 1995; 80:695-705.
143. **Xu D, McSorley SJ, Tetley L, et al.** Protective Effect on Leishmania Major Infection of Migration Inhibitory Factor, TNF-Alpha, and IFN-Gamma Administered Orally Via Attenuated Salmonella Typhimurium. *Journal of Immunology* 1998; 160:1285-9.
144. **Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N.** Prevention of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Antibodies against Alpha 4 Beta 1 Integrin. *Nature* 1992; 356:63-6.

145. **Yu M, Johnson JM, Tuohy VK.** A Predictable Sequential Determinant Spreading Cascade Invariably Accompanies Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: A Basis for Peptide-Specific Therapy after Onset of Clinical Disease. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 183:1777-88.
146. **Yudkin PL, Ellison GW, Ghezzi A, et al.** Overview of Azathioprine Treatment in Multiple Sclerosis. *Lancet* 1991; 338:1051-5.
147. **Zaitseva MB, Mojcik CF, Salomon DR, Shevach EM, Golding H.** Co-Ligation of Alpha4beta1 Integrin and TCR Rescues Human Thymocytes from Steroid-Induced Apoptosis. *International Immunology* 1998; 10:1551-61.
148. **Ziemssen T, Kumpfel T, Klinkert WE, Neuhaus O, Hohlfeld R.** Glatiramer Acetate-Specific T-Helper 1- and 2-Type Cell Lines Produce BDNF: Implications for Multiple Sclerosis Therapy. Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Brain* 2002; 125:2381-91.

Danksagung:

Mein Dank gilt allen voran Herrn Prof. Thomas Forsthuber, der mir die Arbeit an der Case Western Reserve University ermöglicht hat. Außerdem möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Thomas Hünig danken, der mich fachlich und persönlich unterstützt hat.

Finanzielle Hilfe kam von Seiten des Studienförderwerks der Stiftung der Deutschen Wirtschaft und des Boehringer Ingelheim Fonds.

Bei der Korrektur waren besonders mein Bruder Dr. Michael Denking, Dr. Daniel Zeller, Tilmann Schober, Jana Hecker, Tobias Habbig und Dr. Patrick Ott hilfreich.

CLAUDIA MARIA DENKINGER

36 Alton Place
Boston, MA – 02446
USA

PERSÖNLICHES

Geburtsort: Laupheim, Geburtsdatum: 02. Mai 1978

Nationalität: Deutsch

AUSBILDUNG

08/1988 - 05/1997

Gymnasium Ehingen (Donau), Abiturnote: 1,0

08/1997 - 10/2004

Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

Ärztliche Prüfung: Gesamtnote 1,0

United States Medical Licensing Exam Step I/II/III

08/2000 - 11/2001

Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA

Doktorarbeit im Institut für Pathologie über die Immunpathologie der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

02/2005 - 03/2005

London School of Hygiene and Tropical Medicine, England

Kurs in Epidemiologie und Kontrolle von übertragbaren Erkrankungen

BERUF

07/2005 - heute

Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard University, Boston, USA

Facharztausbildung in Innere Medizin

STIPENDIEN

05/1997

Karl-von-Frisch-Preis für herausragende Leistungen im Abiturfach Biologie

08/1999 - 10/2004

Stipendium des Studienförderwerks der “Stiftung der Deutschen Wirtschaft“ (sdw)

09/2000 - 10/2001

Promotionsstipendium der sdw für die Arbeit an der Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA

09/2000 - 12/2000

Reisestipendium von Boehringer Ingelheim, Deutschland

- 04/2002 **Keystone Symposia Stipendium** für die Teilnahme am Kongress zu "T cell tolerance and activation", USA
- 04-2004 - 05/2004 **Homburger Stipendium** der Universität Würzburg für den Aufenthalt an der University of Rochester, New York, USA im Rahmen des Praktischen Jahrs

SPRACHEN

Deutsch: Muttersprache Englisch: verhandlungssicher
 Französisch: fließend Spanisch: gute Kenntnisse

PRAKTIKA

- 08/1997 - 10/1997 **Krankenpflege**, Inverclyde Royal Hospital, Schottland
- 04/1999 **Gynäkologie**, Verbundkrankenhaus Wangen
- 04/2000 **Allgemeinmedizin**, Dinkelsbühl
- 09/2001 **Infektiologie**, University Hospitals, Cleveland, OH, USA
- 09/2002 **Notfallambulanz/Chirurgie**, Mérida, Yucatan, México
- 02/2003 **Pädiatrie**, Kinderklinik der Universität Würzburg
- 10/2003 - 01/2004 **Chirurgie**, Hôpital des Cadolles, Neuchâtel, Schweiz
- 02/2004 - 03/2004 **Infektiologie/ Endokrinologie**, University of Miami, FL, USA
- 04/2004 - 05/2004 **Hämatologie/ Nephrologie**, University of Rochester, NY, USA
- 06/2004 - 09/2004 **Neurologie**, Universität Würzburg

ENGAGEMENT

- 08/1997 - 08/2003 **Studentenverband für Ethik in der Medizin**, Würzburg
- 02/2001 - 08/2001 **Freiwillige klinische Arbeit**, Free Clinic, Cleveland, OH, USA
- 12/2002 **Kongressorganisation**, "HIV/AIDS und seine sozialen und ökonomischen Folgen"
- 10/1999 - 08/2002 **Hilfswissenschaftliche Mitarbeiterin**, physiologisches Institut, Universität Würzburg

FREIZEIT

Tennis (C-Trainer seit 1998), Wandern, Basketball
 Zen, Photographie

Publikationsliste

- 02/2003 **Denkinger CM et al.** “In Vivo Blockade of MIF Ameliorates Acute EAE by Impairing the Homing of Encephalitogenic T cells to the CNS”, *J Immunol*, 2003, 170: 1274-1282.
- 04/2002 **Denkinger CM et al.** “Effects of Blockade of MIF on EAE: Amelioration of acute Disease by Inhibition of the Homing of Encephalitogenic T cells to the CNS”, Abstract & Poster, “Keystone Symposia on T cell tolerance and activation” in Steamboat Springs, Colorado, USA.
- 11/2004 **Denkinger CM et al.** “Macrophage Migration Inhibitory Factor and its Role in Autoimmune Diseases”, *Arch Immunol Ther Exp*, 2004, 52, 389–400 (Review).
- 04/2005 **Denkinger CM et al.** “Cryptosporidium associated cholangitis in a liver-transplant patient”, Abstract & Poster, “European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases” in Kopenhagen, Dänemark.
- 02/2006 **Denkinger CM et al.** “Pertussis toxin-induced cytokine differentiation and clonal expansion of T cells is mediated via costimulatory molecules”, submitted