

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. V. Toyka

Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis in β_2 Mikroglobulin
knock-out Mäusen: axonaler Schaden entsteht unabhängig von
MHC-I Expression

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Evelyn Rott
aus Buch

Würzburg, August 2005

Referent: Prof. Dr. R. Gold

Koreferent: Prof. Dr. A. Marx

Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2006

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Multiple Sklerose und EAE: eine Einführung	1
1.2.	CD8 T-Zellen und MS	3
1.3.	CD8 T-Zellen und EAE: pathogene und regulierende Funktion	4
1.4.	Axonaler Schaden	5
1.4.1.	Geschichte	5
1.4.2.	Auswirkung auf den Krankheitsverlauf	6
1.4.3.	Pathogenetische Vorstellung	7
1.5.	β_2 Mikroglobulin defiziente Mäuse	8
1.6.	Ziel der Studie	9
2.	Material und Methoden	10
2.1.	Tiere	10
2.2.	Induktion und klinische Evaluation der EAE	11
2.3.	Histologie	11
2.3.1.	Gewebeentnahme	11
2.3.2.	H&E-Färbung	12
2.3.3.	Luxol Fast Blue-Färbung	12
2.4.	Immunhistochemie	13
2.5.	Lymphozytenproliferationsassay	14
2.6.	statistische Analyse	15
3.	Ergebnisse	17
3.1.	MOG ₃₅₋₅₅ – EAE: schwere Erkrankung der $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse	17

3.2.	rMBP – EAE: $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse sind stärker betroffen als Kontrolltiere	20
3.3.	rhMOG – EAE: $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse sind stärker betroffen	24
3.4.	Histologie: Unterschiede in entzündlicher Infiltration und vermehrter axonaler Schaden bei $\beta_2m^{-/-}$ Mäusen	25
3.4.1.	perivaskuläre und parenchymale Infiltrate	25
3.4.1.1.	Inflammatorischer Index	25
3.4.1.2.	T-Zellinfiltration	27
3.4.1.3.	Makrophageninfiltration	31
3.4.2.	Demyelinsierung und axonaler Schaden	33
3.4.2.1.	LFB-Färbung	33
3.4.2.2.	APP-Färbung	34
3.5.	Lymphozytenproliferationsassay: Kein Unterschied in Stimulierbarkeit und „Priming“ zwischen den Tiergruppen	36
4.	Diskussion	39
4.1.	Klinischer Verlauf	39
4.2.	Rolle der CD8 T-Zellen	39
4.3.	Axonaler Schaden	41
4.4.	Induktion einer EAE in C57BL/6 Mäusen mit rMBP	43
5.	Zusammenfassung	44
6.	Literaturverzeichnis	46
7.	Liste der Abkürzungen	54

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose und EAE: eine Einführung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen des jungen Erwachsenenalters in den gemäßigten Breiten. Es handelt sich um eine schubförmig bzw. chronisch-progredient verlaufende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) mit typischen Veränderungen im periventrikulären Marklager, Sehnerv, Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark. Man geht zur Zeit von ca. 120.000 Erkrankten in Deutschland und 1,2 Millionen weltweit aus. Die MS manifestiert sich vor allem zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr und betrifft Frauen beim schubförmigen Verlauf in etwa zweimal häufiger als Männer. Histopathologische Auffälligkeiten, die sich im Laufe der Erkrankung zeigen, sind vor allem Infiltration von Entzündungszellen, Demyelinisierung, Gliose und besonders in letzter Zeit im Zentrum des Interesses, auch axonale Schädigung.

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein Tiermodell, welches unterschiedliche Facetten der MS-Pathologie widerspiegelt. Sie kann aktiv durch Injektion verschiedener Antigene oder passiv durch Transfer antigenspezifischer Zellen (Panitch und McFarlin, 1977) induziert werden. Je nach Wahl des Tierstamms und Antigens, verläuft sie als akute oder chronisch-rezidivierende, entzündliche und zum Teil auch demyelinisierende ZNS-Erkrankung mit axonaler Schädigung. Zur näheren Charakterisierung potentieller Autoantigene wurde eine Vielzahl von Experimenten mit unterschiedlichen Immunisierungsansätzen durchgeführt. Schon früh wurde erkannt, dass eine EAE durch Injektion von Gesamtmyelin oder gereinigten Myelinbeständen, z. B. dem basischen Myelinprotein (MBP) oder dem Proteolipidprotein (PLP), ausgelöst werden kann (Übersicht Martin et al. 1992). Auch andere Myelinproteine wurden als potentielle Autoantigene entdeckt, wie z. B. das Myelin-assoziierte Glykoprotein oder das Myelin-Oligodendrozyten-

Glykoprotein (MOG). Desgleichen können auch Antigene, die nicht Myelinbestandteil sind, Ziel der Autoimmunreaktion werden, wie z. B. das Protein S-100, ein Signalprotein in Gliazellen (Kojima et al., 1994). Mit MOG konnte in verschiedenen Rattenstämmen annähernd das gesamte Spektrum der MS Pathologie reproduziert werden. Daher wird dieses als eines der bedeutsamsten Antigene bei der Entstehung von zentralen Autoimmunerkrankungen angesehen (Storch et al. 1998). Eingehendere Untersuchungen befassten sich mit der Frage welche T-Zellepitope des MOG autoantigene Eigenschaften haben (Mendel et al., 1995). Dabei stellte sich speziell das MOG Peptid 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) als enzephalitogen und Auslöser permanenter neurologischer Defizite heraus. In C57BL/6 (H-2b) Mäusen entwickelte sich eine chronische Erkrankung mit überlagernden Schüben (Mendel et al, 1995; Slavin et al. 1998). Histologisch fand sich neben zellulärer Infiltration auch multifokale Demyelinisierung und axonaler Schaden (Linker et al., 2002).

Eine mit MBP induzierte EAE verläuft in den meisten Tiermodellen akut monophasisch, mit anschließender Resistenz. Histologisch zeichnet sich die MBP-EAE durch eine starke Entzündungsreaktion, ohne wesentliche demyelinisierende Komponente aus (Gold et al., 2000). Einige Mausstämme galten bisher als resistent gegen die Induktion einer MBP-EAE (Raine et al., 1980; Bernard, 1976; Fritz et al., 1985). Andere Mausstämme (SJL) zeigten nach Verabreichung von MBP ein chronisch-rezidivierenden Krankheitsverlauf (Fritz et al., 1983).

Die Ätiologie der Multiplen Sklerose konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Nach heutigem Wissenstand handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung bei der unter anderem genetische Faktoren, z. B. erhöhte Suszeptibilität für MS bei Trägern des HLA-DR2 Allels, und Umwelteinflüsse als bedeutend angesehen werden. Autoimmune Gewebsschädigung kann sowohl durch autoreaktive T- als auch B-Zellen verursacht werden. Zytotoxische CD8 T-Zellen können direkt oder indirekt Gewebsschäden hervorrufen. CD4 T-Zellen vom Subtyp T_H1 tragen durch

Aktivierung von Makrophagen indirekt zur Gewebsschädigung bei. CD4 T_H2 Zellen wiederum steuern durch die Aktivierung autoreaktiver B-Zellen zur Gewebsschädigung bei.

Anfang der 90er Jahre wurde durch mehrere Studien deutlich, dass die Autoimmunreaktion welche einer EAE oder MS zugrundeliegt, am ehesten durch T-Zellen vermittelt wird. Zelltransferexperimente zeigten, dass der entscheidende Faktor bei der Entstehung einer mit MBP induzierten EAE die zelluläre, T-Zell vermittelte Autoimmunität ist und nicht die humorale, Antikörper vermittelte Autoimmunität (Übersicht in Zamvil, Steinman, 1990). Die sogenannte Split-Well-Methode (Pette et al., 1990) ermöglichte es erstmals auch aus dem Blut von MS Patienten myelinspezifische, autoreaktive T-Zellen zu gewinnen. Die mit den üblichen Zellkulturmethoden generierten autoreaktiven T-Zellen waren CD4 positiv und vor allem vom Subtyp T_H1. Lange Zeit standen somit die CD4 T-Zellen im Mittelpunkt des Interesses der MS-Forschung. Jüngere Studien zeigten jedoch, dass auch CD8 T-Zellen für den Verlauf der MS eine Rolle spielen können.

1.2. CD8 T-Zellen und MS

Aktive, demyelinisierende MS Läsionen werden von CD8 T-Zellklonen dominiert. CD4 T-Zellen lagen in geringerer Anzahl und in mehr heterogener Form vor (Babbe et al., 2000). Auch im Liquor von MS Patienten konnte eine selektive Anreicherung von CD8 T-Gedächtniszellen nachgewiesen werden, was eine Rolle dieser Zellen für den Verlauf der MS nahe legt (Jacobsen et al., 2002; Skulina et al., 2004). Mehrere Autoantigene, z. B. MBP und PLP haben die Fähigkeit spezifische, zytotoxische CD8 T-Zellreaktionen *in vitro* hervorzurufen (Tsuchida et al., 1994). Diese so aktivierten CD8 T-Zellen produzierten außerdem TNF alpha und auch Interferon γ , beides Zytokine, denen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung demyelinisierender Erkrankungen zugeschrieben wird. Derart generierte, MBP spezifische, CD8 T-Zellen sind in der Lage, MHC I exprimierende, humane Oligodendrozyten *in vitro* zu zerstören (Jurewicz et al., 1998). So könnten zytotoxische CD8 T-Zellen

zur Gewebsschädigung bei MS beitragen. Auch Neurone exprimieren unter bestimmten Umständen, z. B. nach Blockade von Natriumkanälen oder Stimulation mit Interferon γ (IFN- γ), das MHC I Molekül (Neumann et al., 1997) und werden dadurch ebenfalls zum Ziel zytotoxischer CD8 T-Zellen (Medana et al., 2001). Axonale Schädigung bei der MS könnte daher eng mit CD8 T-Zellzytotoxizität verbunden sein (Übersicht Neumann et al., 2002).

1.3. CD8 T-Zellen und EAE: pathogene und regulierende Funktion

Die pathogene Rolle von Myelin spezifischen CD8 T-Zellen wurde in mehreren EAE-Tiermodellen reproduziert. Der Transfer von CD8 positiven enzephalitogenen, MOG spezifischen T-Zellen in C57BL/6 Mäuse führte zu schwerer und permanenter Krankheit der Tiere. Verglichen mit einer „aktiv“ durch MOG induzierten EAE in Mäusen mit demselben genetischen Hintergrund war die Krankheit hier progredienter, fulminanter und auch destruktiver. Untergang des Myelins durch Vakuolenbildung und Wallerische Degeneration der Axone waren die Folge (Sun et al. 2001; Huseby et al. 2001). Doch auch regulierende Funktionen von CD8 T-Zellen konnten anhand von Transferversuchen, Depletion von CD8 T-Zellen oder in sogenannten „knock-out“ Tiermodellen nachgewiesen werden. Eine EAE in Lewis Ratten und SJL Mäusen konnte unterdrückt werden, indem man die Tiere vorher, durch orale Gabe, an MBP in niedriger Dosierung „gewöhnte“ (tolerisierte). Sowohl CD4 als auch CD8 T-Zellen dieser Tiere produzierten dann vermehrt TGF- β , Interleukin (IL)-4 und IL-10, während IFN- γ vermindert ausgeschüttet wurde. Durch Transfer von CD8 T-Zellen aus MBP-tolerisierten SJL Mäusen wurde auch in den Empfänger-mäusen eine EAE unterdrückt (Chen et al., 1995). Jiang und Mitarbeiter beschrieben einen denkbaren Mechanismus, durch den die CD8 T-Zellen diese Schutzfunktion ausüben könnten. Nach Aktivierung der CD8 T-Zellen durch CD4 T_H1 -Zellen induzieren erstere eine Verschiebung der CD4 T-Zell-Subgruppe von T_H1 zu T_H2 Zellen, was dann die Suppression der Erkrankung bewirkt (Jiang et al., 2001). T_H2 Zellen unterstützen zwar die humorale Immunantwort, unterdrücken jedoch die zelluläre, zur Krankheit

beitragende Immunreaktion. Auch das Zytokinmuster (TGF- β , IL-10 und IL-4; s.o.) in den Mäusen zeigt eine Differenzierung der CD4 T-Zellen zu T_H2 Zellen. Nach Induktion einer EAE in Mäusen durch aktive Immunisierung mit MBP waren diese nach dem ersten Erkrankungsschub resistent gegen eine nochmalige EAE Induktion mit MBP. Durch antikörpervermittelte Depletion von CD8 T-Zellen in diesen Mäusen ließ sich mittels einer erneuten Immunisierung jedoch wieder eine Krankheit auslösen. Die Mäuse waren also nicht länger resistent, was wiederum eine regulierende Funktion der CD8 T-Zellen nahe legte (Jiang et al., 1992).

In CD8 „knockout“ Mäusen war nach Induktion einer EAE die Krankheitssymptomatik zunächst milder ausgeprägt als in den Kontrolltieren. Allerdings verlief die EAE bei den knock-out Mäusen, im Gegensatz zu den Kontrolltieren, chronisch und mit erhöhter Schubrate (Koh et al., 1992). Hier wurde sowohl eine pathogene als auch regulierende Funktion der CD8 T-Zellen nahegelegt.

1.4. Axonaler Schaden

1.4.1. Geschichte

Die MS als Krankheitsentität wurde erstmals von Charcot 1868 umfassend als entzündliche, demyelinisierende ZNS-Erkrankung beschrieben, bei der Axone relativ unbeeinträchtigt bleiben. Allerdings fand Charcot schon Veränderungen an Axonen in MS Läsionen, wie z. B. Schwellungen oder Durchmesseränderung (Charcot; 1868, 1880). Der deutsche Neuropathologe Carl Fromann berichtete außerdem von Kontinuitätsdurchtrennung und damit Zerstörung von Axonen in MS Plaques (Fromann, 1878). Axonale Schädigung war demnach schon seit langem als Bestandteil der MS-Pathogenese aufgefallen, konnte aber auf Grund unzureichender Untersuchungs- und Darstellungsmöglichkeiten nicht quantitativ belegt werden und geriet auch daher einige Zeit in Vergessenheit (Übersicht Kornek, Lassmann, 1999).

1.4.2. Auswirkung auf den Krankheitsverlauf

Durch verbesserte technische Möglichkeiten und somit neu geschaffene Einblicke in die Pathophysiologie der MS gewann der axonale Schaden wieder zunehmend an Bedeutung für die Forschung. Verschiedene Magnet-Resonanz-Studien, die sich des N-Acetylaspartate als Indikator für axonale Integrität bedienten, verdeutlichten, dass der axonale Schaden in MS Läsionen wesentlich stärker ausgeprägt ist als bis zu diesem Zeitpunkt angenommen wurde (Barnes et al., 1991)(van Walderveen, 1995,1998). Auch histologische Studien zeigten, dass zerstörte Axone ein typisches Merkmal von MS Läsionen sind (Trapp et al., 1998).

Eine der wohl wichtigsten Beobachtungen war, dass kumulativer axonaler Schaden zur permanenten, neurologischen Beeinträchtigung beiträgt. Nicht nur in MR-Studien bei MS (Davie et al., 1995), (DeStefano et al., 2001), sondern auch in einem chronisch, schubförmig verlaufendem Tiermodell der EAE, fand sich eine Korrelation zwischen Ausmaß der axonalen Schädigung und der chronischen Beeinträchtigung der Tiere (Wujek et al., 2002).

Axonaler Schaden ist nicht das Endergebnis wiederholter entzündlicher Ereignisse, sondern beginnt bereits in den frühesten Krankheitsstadien. Dies wurde in mehreren MR-Studien (DeStefano et al, 2001), (Filippi et al., 2003), (Übersicht Trapp et al., 1999) und ebenfalls durch histologische Untersuchungen von MS Plaques (Kuhlmann et al., 2002) belegt. Auch bei einem mit MOG₃₅₋₅₅ induziertem EAE Modell fand sich axonaler Schaden schon in den frühesten Erkrankungsstadien. Im Verlauf der EAE nahm das Ausmaß der Schädigung mit der Anzahl an weiteren Schüben zu (Onuki et al., 2001). Eine Atrophie des Hirngewebes im MRT lässt sich schon zu Beginn der MS nachweisen. Im Laufe der Zeit nimmt diese, auch bei schubförmig verlaufender MS ohne permanente neurologische Behinderung, immer mehr zu. Dies legt die Annahme nahe, dass Kompensationsmechanismen die neurologischen Funktionen aufrechterhalten bis eine gewisse Schwelle an zerstörten Nervenfasern überschritten wird, was dann zu chronischer und fortschreitender Beeinträchtigung führt. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der axonalen

Schädigung könnte somit den Zeitpunkt des Übergangs einer schubförmig verlaufenden MS in eine sekundär-progrediente MS bestimmen (Übersicht Trapp et al. 1999, Bjartmar et al., 2003). Dies würde erklären, warum in den letzten 30 Jahren keine zufriedenstellende immunologische Erklärung für die sekundär progrediente MS gefunden wurde.

1.4.3. Pathogenetische Vorstellung

Entzündliche Demyelinisierung wird in pathologischen Studien meist als Hauptursache für axonale Verletzung und Degeneration angesehen. Die höchste Inzidenz axonaler Verletzungen zeigt sich zwar während aktiver Demyelinisierung, aber auch in inaktiven demyelinisierenden Plaques findet sich, wenn auch weitaus weniger, Schädigung von Nervenfasern (Kornek et al., 2000), (Bitsch et al., 2000). Daher scheint ein aktiver Entzündungsvorgang zur Beeinträchtigung der Axone nicht zwingend notwendig zu sein. Aber nicht nur innerhalb der Läsionen, auch in normal erscheinender, nicht demyelinisierter weißer Substanz, sind geschädigte Nervenfasern vorhanden (Kornek et al., 2000), (Bjartmar, Trapp, 2003). Dies ist eventuell die Konsequenz einer Wallerschen Degeneration der Axone distal der entzündlichen Veränderungen, die hier auch ohne Demyelinisierung stattfindet (Bjartmar et al., 2001). Ein Zusammenhang zwischen Inflammation und Ausmaß an axonalem Schaden in Läsionen konnte in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden (Trapp et al., 1998). Im Einzelnen wurde eine Korrelation zwischen Anzahl von Makrophagen, Mikroglia und zytotoxischen CD8 T-Zellen mit der Höhe an axonalem Schaden gezeigt (Bitsch et al., 2000), (Kuhlmann et al., 2002), (Übersicht Neumann, 2003).

Nachfolgend werden einige molekulare, potentiell zu axonalem Schaden führende Mechanismen beschrieben:

- Autoreaktive, MBP-spezifische T-Zellen können durch Aktivierung von Mikroglia zum axonalen Schaden beitragen (Gimsa et al., 2000).
- Makrophagen exprimieren Matrix Metalloproteinasen in MS Läsionen, welche potentiell axonalen Verlust verursachen können (Anthony et al., 2000), (Newman et al., 2001).

- Glutamat wird in großen Mengen von aktivierten Immunzellen freigesetzt und scheint ein wichtiger, zur axonalen Schädigung beitragender Faktor zu sein (Pitt et al., 2000).
- NO als Entzündungsmediator liegt im ZNS von MS Patienten in erhöhter Konzentration vor und führt zu reversiblen Leitungsblöcken in normalen und demyelinisierten Axonen (Redford et al., 1997).
- Auch erhöhter Calciumeinstrom in demyelinisierte Axone kann zu deren Schädigung führen (Kornek et al., 2001).
- Am EAE-Modell wurde gezeigt, dass vermehrtes intrazelluläres Calcium in Glia- und Entzündungszellen eine Steigerung der Calpainaktivität zur Folge hat, was wiederum zum Abbau von Myelinproteinen und axonalem Verlust führt (Schaecher et al., 2001)(Banik et al., 1997).
- Neurone, Oligodendrozyten, Mikroglia und Endothelzellen exprimieren unter bestimmten Umständen *in vitro* und *in vivo* MHC I, und können so Ziel zytotoxischer T-Zellen werden (Redwine et al., 2001), (Medana et al., 2001), (Neumann, 2002).

1.5. β_2 Mikroglobulin defiziente Mäuse

Axonale Schädigung im Rahmen einer EAE oder MS könnte durch MHC I Expression auf Neuronen und damit korrespondierenden CD8 zytotoxischen T-Zellen entstehen. Die Möglichkeit zur näheren Untersuchung der Rolle des MHC I Moleküls im Immunsystem bieten genetisch veränderte Mäuse, denen das β_2 Mikroglobulin fehlt (β_2m knock-out Mäuse, Koller et al., 1990; Zijlstra et al., 1990). β_2m ist eine Untereinheit des MHC I-Moleküls. Ist β_2m nicht vorhanden, so kann das MHC I Molekül nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden. Somit finden sich bei β_2m knock-out Mäusen keine MHC I Moleküle an der Zelloberfläche (Zijlstra et al., 1990). MHC I Moleküle sind wiederum ausschlaggebend für die Selektion und somit das Überleben von CD8 T-Zellen. Zijlstra und Mitarbeiter wiesen nach, dass β_2m knock-out Mäuse über keine reifen CD8 T-Zellen verfügen und die CD8 T-Zell vermittelte Zytotoxizität defekt ist. Auch die NK-Zell-Funktionalität, $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ T-Zellen und einige

Unterformen von $\gamma\delta$ -Zellen scheinen betroffen zu sein (Raulet, 1994), wohingegen die Verteilung von $CD4^+8^+$ und $CD4^+8^-$ Zellen normal ist. Die Mäuse zeigen keinen spezifischen Phänotyp, sind fruchtbar und gesundheitlich nicht beeinträchtigt (Zijlstra et al., 1990), (Koller et al., 1990). In suszeptiblen Mausstämmen lässt sich mit dem Theiler Virus eine chronische, demyelinisierende ZNS-Erkrankung auslösen. In einer so induzierten Modellerkrankung zeigten β_2 Mikroglobulin knock-out Mäuse in der Histologie ausgeprägte Demyelinisierung, welche jedoch keine neurologischen Defizite nach sich zog (Rivera-Quinones et.al., 1998). Im selben Modell fand sich in β_2m knock-out Mäusen im Vergleich zu SJL Mäusen etwa gleich viel Demyelinisierung, jedoch weitaus weniger axonaler Schaden. Dies deutet wiederum darauf hin, dass axonaler Schaden und Demyelinisierung zumindest teilweise unabhängig voneinander ablaufen und dass zytotoxische CD8 T-Zellen direkt zu axonalem Schaden beitragen können (Ure et al., 2002). Andere Studien mit dem Theiler Virus-Modell zeigten bei β_2m knock-out Mäusen im Vergleich zu naiven SJL Mäusen jedoch einen früheren Krankheitsbeginn, mehr Demyelinisierung und erhöhte Makrophageninfiltration (Begolka et al., 2001). Hier wird wiederum eine regulierende CD8 T-Zellfunktion vermutet. In einem mit MOG induziertem EAE-Modell begann bei den β_2m knock-out Mäusen die Symptomatik früher, und war stärker ausgeprägt als in den Kontrolltieren (Fritz et al., 2001), (Zhang et al., 1997).

1.6. Ziel der Studie

Zur näheren Untersuchung der Rolle von CD8 T-Zellen und des MHC I Moleküls im entzündlich demyelinisierenden Tiermodell, induzierten wir mit MOG₃₅₋₅₅, rekombinantem humanen MOG oder erstmals mit Ratten-MBP (rMBP-EAE, Induktion nach Linker et al., 2005) eine EAE in β_2m knock-out Mäusen.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

Die $\beta 2m^{-/-}$ Mäuse wurden im Institut für Immunologie der Universität Würzburg für mindestens 6 Generationen auf C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt (Zijlstra et al, 1990). Als Kontrolltiere wurden neben C57BL/6 (Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland) auch $\beta 2m^{+/-}$ Tiere verwendet, welche über ein normales CD8 T-Zellrepertoire verfügen. Die Mäuse waren zwischen 8 und 12 Wochen alt mit einem Gewicht von 20 - 30 g. Sie wurden in Plastik Käfigen ohne Gitterboden gehalten und erhielten handelsübliches Nagerfutter und Trinkwasser ad libitum.

Alle Versuche wurden gemäß den Bestimmungen der Bayerischen Staatsregierung für Tierexperimente durchgeführt und von der zuständigen Veterinärbehörde genehmigt sowie überwacht.

2.2. Induktion und klinische Evaluation der EAE

Zur Induktion der EAE wurden 200 μg MOG 35-55 Peptid (Prof. Palm, Würzburg, Deutschland), 200 μg rekombinantes humanes MOG Protein (rhMOG, hergestellt nach Adelman et al, 1995) oder 200 μg Ratten MBP (rMBP, gereinigt nach Oshiro und Eylar, 1970) in 200 μl Volumen, s.c. in die Flanken und die Schwanzbasis der narkotisierten Mäuse injiziert. Das Volumen setzte sich aus jeweils denselben Anteilen an PBS und CFA (komplettes Freundesches Adjuvans, Konz.: 2mg/ml; Difco, Detroit MI, USA) zusammen. Letzteres enthält Mycobacterium tuberculosis H37RA (Difco, Detroit MI, USA). Die Endkonzentration des Injektionsgemisches betrug 1 mg/ml an Antigen und CFA.

24 und 72 Stunden nach der Immunisierung wurde unter Fixation durch geübten Griff pro Maus 400 ng Pertussis Toxin (PTX; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) intraperitoneal gegeben.

Vorversuche zeigten, dass zur Induktion der EAE mit rMBP eine zusätzliche Immunisierung an Tag 15 nötig war. Hier wurden wiederum 200 µg rMBP, gefolgt von PTX an Tag 16 und 18, verabreicht.

Die Tiere wurden täglich gewogen und auf Krankheitssymptome hin untersucht. Die Ausprägung der Krankheit wurde anhand der klinischen Symptomatik auf einer Skala von 0 bis 10 beurteilt (Linker et al, 2002):

- 0 = gesund,
- 1 = reduzierter Tonus der Schwanzspitze,
- 2 = schlaffer Schwanz
- 3 = Gangataxie, wackelnder Gang,
- 4 = Stand- und Gangataxie,
- 5 = Parese eines Beines bis leichte Paraparese,
- 6 = mittelschwere Paraparese oder Plegie eines Hinterbeines,
- 7 = schwere Paraparese oder Paraplegie,
- 8 = Tetraparese, Bewegung nur schleifend,
- 9 = schwere Tetraparese, moribund,
- 10 = tot

2.3. Histologie

2.3.1. Gewebentnahme

Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten wurde das Rückenmark aus unter Narkose perfusionsfixierten Tieren zum Zeitpunkt der maximalen Krankheitsausprägung (bei mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten Tieren Tag 27 p.i., bei mit rMBP immunisierten Tieren Tag 30 p.i.) entnommen. Die Mäuse wurden mit Pentobarbital (Narcoren, Rhone Merieux, Laupheim) i.p. anästhesiert, über den linken Ventrikel mit PBS perfundiert und anschließend mit phosphatgepuffertem, 4% Paraformaldehyd (PFA; pH 7,4) fixiert.

Das Rückenmark wurde von sakral bis zervikal im ganzen entnommen, in 4% PFA 2 Stunden nachfixiert, gewaschen und in 5 mm dicke Scheiben

geschnitten. Im „Automaten“ wurden das Gewebe durch sukzessive Überführung aus wässriger in die Paraffinphase dehydriert, und anschließend aufrecht stehend in Paraffin eingebettet.

Zur Cryofixation wurden die Tiere am Krankheitsmaximum (Tag 24 p.i.) in tiefer Nakrose getötet, mit Ringer-Lösung ausgeblutet und das Gewebe dann unfixiert präpariert. Nach Schneiden des Rückenmarks in 5 mm dicke Scheiben, wurden die Gewebstücke aufrecht stehend in Tissue-Tek gegeben, und danach in durch flüssigen Stickstoff vorgekühltem 2-Methylbutan für spätere immunhistochemische Untersuchungen schockgefroren und bei - 80 ° Celsius gelagert.

2.3.2. H&E-Färbung

Zum Vergleich der Entzündungsaktivität wurde eine H&E-Färbung zur Darstellung der Infiltrate in den Rückenmarksquerschnitten durchgeführt. 5 µm dicke Querschnitte des paraffingebetteten Gewebes wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen, getrocknet, in Xylol entparaffiniert und dann rehydriert. Anschließend wurde 10 Minuten in Hämatoxylin gefärbt, 10 min gewässert und dann weitere 5 Minuten in Eosin gegeben. Nach Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe und 15 min in Xylol wurden die Schnitte mit Vitro-Clud eingedeckelt und getrocknet.

2.3.3. Luxol Fast Blue-Färbung

Zur Bestimmung des Ausmaßes an Demyelinisierung wurde 5 µm dicke Rückenmarksquerschnitte mit Luxol Fast Blue (LFB) gefärbt. Auf Grund der Affinität des LFB zum im Myelin enthaltenen Neurokeratin können so myelinisierte Fasern dargestellt werden. Nach Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung in 96% Ethanol, wurden die Schnitte über Nacht bei 60° Celsius in die Luxol-Fast-Blue Lösung (1g LFB MBS in 1000ml 96% Ethanol über Nacht bei 60° Celsius lösen, 5 ml 10 % Essigsäure zugeben, Filtrieren) transferiert. Nach Waschen mit 96 % Ethanol und Aqua dest. wurde zur Differenzierung der

Färbung 0,1 % Lithiumcarbonat für ca. 5 Minuten auf die Schnitte gegeben. Es erfolgte eine mikroskopische Kontrolle des Färbeergebnisses (Myelinscheiden türkis, Graue Substanz farblos), um gegebenenfalls die Differenzierung nochmals durchzuführen. Anschließend wurden die Schnitte für 20 Sekunden in 70% Ethanol getaucht und dann mit Aqua dest. gewaschen. Zur Gegenfärbung erfolgte eine PAS Darstellung, indem die Schnitte 10 Minuten in Perjodsäure 0,8% gegeben, wieder mit Aqua dest. gewaschen und danach 20 Minuten in Schiff'sche Reagenz transferiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit einer Sulfit-Waschlösung und 10 minütigem Wässern, wurden die Schnitte rehydriert, 5 Minuten in Xylol gegeben und anschließend mit Vitro-Clud eingedeckelt.

2.4. Immunhistochemie

Zur weiteren Differenzierung der Entzündungsinfiltrate wurden Färbungen mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker von T-Zellen (CD3, CD4, CD8) und Makrophagen/Mikroglia (Mac-3) durchgeführt.

Die Färbung des Amyloid Precursor Proteins (APP) diente zur Einschätzung der axonalen Schädigung. APP wird in Neuronen produziert und anterograd transportiert. Im Falle einer axonalen Schädigung ist der Transport unterbrochen und APP akkumuliert im proximal der Verletzung liegenden axonalen Ende (Kuhlmann et al, 2002).

Die Immunhistochemie wurde an 5 µm dicken Paraffinschnitten, wie in Linker et al. 2002 beschrieben, durchgeführt. Wenn nötig wurde eine Antigendemaskierung durch 30 minütiges Kochen der Schnitte in der Mikrowelle, in entweder 10 mM Citratpuffer (Mac-3, APP) oder 1 mM EDTA-Puffer (CD3), erreicht.

Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch 15 minütige Inkubation mit bovinem Serumalbumin (10% BSA in 0,05 M TBS) verhindert.

Die CD3 Färbung wurde mit einem Ratten anti-CD3 Antikörper (Serotec; Wiesbaden, verdünnt 1:400), die Mac-3 Färbung mit einem Ratten anti-Maus Mac-3 Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg; verdünnt 1:200) und die APP

Färbung mit einem MAB348 Antikörper (Chemicon, Hofheim, 1:1000 verdünnt), durchgeführt. Alle Primärantikörper wurden in 1% BSA in TBS verdünnt und über Nacht bei 4 ° Celsius inkubiert. Zur Negativkontrolle wurde jeweils ein Gewebsschnitt nur mit 1% BSA in TBS ohne Primärantikörper versehen. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase mit 30% H_2O_2 und 0,2 M Na-Azid in Methanol wurden die Primärantikörper mit dem ABC-System detektiert. Hierfür wurden die Schnitte zuerst mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Kaninchen anti-Ratte Antikörper bei CD3 und MAC-3 Färbung, Ziegen anti-Maus Antikörper bei APP-Färbung; Vector via Linavis, Wertheim) eine Stunde, und anschließend mit dem Avidin-Biotin-Enzym-Komplex (DAKO, Hamburg) 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Färbesubstrat für die Peroxidase-reaktion diente 3,3' - Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (Kem-En-Tec, Kopenhagen, Dänemark). Alle Schnitte wurden mit Hämalaun für 15 bis 30 Sekunden gegengefärbt, dehydriert und nach Xylol mit Vitro-Clud eingedeckelt. Als Positivkontrolle wurde bei der CD3-Färbung ein mitgefärbter Mausmilz Anschnitt, bei der Mac-3 Färbung eine Braunfärbung der Substantia gelatinosa und bei der APP Färbung eine Braunfärbung der Neurone in der Substantia alba gewertet.

Die CD4 und CD8 Färbungen wurden an Standardgefrierschnitten mit Hybridomzellüberständen (1:50 und 1:700; erhalten von Prof. Zinkernagel, Zürich) durchgeführt. Als Sekundärantikörper dienten hier ein Kaninchen anti-Maus oder Kaninchen anti-Ratte Antikörper (1:100, DAKO oder 1:100, Vector).

2.5. Lymphozytenproliferationsassay

Um die Spezifität der rekrutierten Immunzellen zu bewerten, wurden den mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten $\beta 2m^{-/-}$ Mäusen und den zugehörigen C57BL/6 Kontrolltieren 12 Tage nach der Immunisierung die inguinalen Lymphknoten entnommen und mit deren Primärzellkulturen Proliferationsversuche durchgeführt (Linker et al, 2002). Neben Stimulation der Zellen mit den spezifischen Antigenen MOG₃₅₋₅₅ und rMBP, wurden Phytohämagglutinin

(PHA) und Concanavalin A (ConA) sogenannte Mitogene verwendet, die relativ unspezifisch B- und T-Zellen aktivieren. Letztere zeigen die allgemeine Lymphozytenaktivierbarkeit an. Die Effizienz der Immunisierung wurde durch in vitro Stimulation mit Purified Protein Derivative (PPD) getestet, welches ein Bestandteil des bei der Immunisierung verabreichten CFA ist. Nach Messung der Inkorporation von tritiummarkierten Thymidin, wurde der Stimulationsindex (SI = eingebaute Radioaktivität in Kulturen mit Antigen/ eingebaute Radioaktivität in Kulturen ohne Antigen) errechnet.

Den Mäusen wurde das Antigen in selber Konzentration wie zur EAE Induktion und ebenfalls in Emulsion mit CFA (s.o.), s.c. in eine Fußsohle verabreicht (jeweils ca. 50 µl) und der Rest des insgesamt 200 µl Volumens s.c. in die Flanken. Nach Präparation der Lymphknoten an Tag 12 p.i. wurden diese steril über Siebe in EH-Medium suspendiert (Einzelzellsuspension), nach Zentrifugation und Absaugen des Überstands die verbliebenen Zellen in 1ml RPMI-Medium überführt und gezählt. 2×10^5 Zellen in 100 µl RPMI-Medium wurden pro well in eine 96-Well-Rundboden-Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und mit folgenden Antigenen stimuliert:

MOG 35-55 (Konz.: 10µg/ml), rMBP (Konz.: 10µg/ml), Purified Protein Derivative (PPD; Konz.: 10µg/ml), Phytohämagglutinin (PHA; Konz.: 10µg/ml), Concanavalin A (ConA; Konz.: 2,5µg/ml). Bei ausreichender Zellzahl wurden Triplett-, anderenfalls Duplett-Kulturen, einschließlich einer Leerkontrolle angelegt, und diese für 56 Stunden im Brutschrank bei 37° Celsius und 5% CO₂ gehalten. 16 Stunden bevor die Zellen geerntet werden konnten, wurden sie mit 0.2 µCi (1mCi = 37MBq)/ well ³H-Tritium-Thymidin (tritiated Thymidin, Amersham-Buchler, Braunschweig) markiert. Mit einem automatischen 96-Well-Zellerntegerät (Pharmacia, Freiburg) wurden die Zellen gewaschen, über eine Filtermatte geleitet und gesammelt, und anschließend die Beta-Strahlungsaktivität mit einem 96-Well-Betaplate-Szintillationszähler (Pharmacia, Freiburg) in Impulsen/min gemessen.

2.6. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung des Krankheitsverlaufes erfolgte, sowohl bei den mit MOG 35-55 immunisierten als auch bei den mit rMBP immunisierten Tieren, unter jeweiliger Zusammennahme dreier, unter den selben Bedingungen durchgeführter Experimente. Daraus ergab sich eine letztendliche Tierzahl von 17 knock outs mit 21 Kontrollen für die MOG 35-55 Versuche, und 12 knock outs mit 16 Kontrollen für die rMBP Versuche. Aus den Einzelergebnissen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, zur Bestimmung der Signifikanz wurde im SPSS Statistikprogramm der Mann-Whitney-U Test oder der Chi-Quadrat-Test herangezogen (SPSS, Chicago, USA).

Die histopathologischen Auswertungen erfolgten alle geblindet, jeweils anhand einer Versuchsreihe mit Hilfe eines Zählrasters mit definierter Größe.

Zur Bestimmung des Inflammatorischen Index (Infiltrate/mm² Rückenmark; Eugster et al, 1999) wurde die Anzahl an Infiltraten pro mm² Rückenmark auf 8 bis 10 unabhängigen Rückenmarksebenen pro Maus gezählt. Für die Quantifizierung der CD3 T-Zellen und Makrophagen wurden je Tier ein lumbaler, ein thorakaler und ein zervikaler Querschnitt gewählt. Pro Querschnitt wurden die Anzahl der Zellen/mm² in 10 Zählfelder in 10 definierten Arealen, die graue und weiße Substanz miteinschlossen, in entweder 250er Vergrößerung (CD3) oder 400er (Mac-3) ausgezählt. APP positive Axone wurden pro Maus in je 3 definierten Arealen von 8 bis 10 unabhängigen Rückenmarksebenen, in 400er Vergrößerung gezählt.

Signifikanzbestimmungen erfolgten ebenfalls mit den oben genannten Tests und wurden in p-Werten angegeben. Als statistisch signifikant gewertet wurden die Wahrscheinlichkeiten *p < 0,05 und **p < 0,01 und ***p < 0,001.

3. Ergebnisse

3.1. MOG₃₅₋₅₅ – EAE: schwere Erkrankung der $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse

Krankheitsverlauf

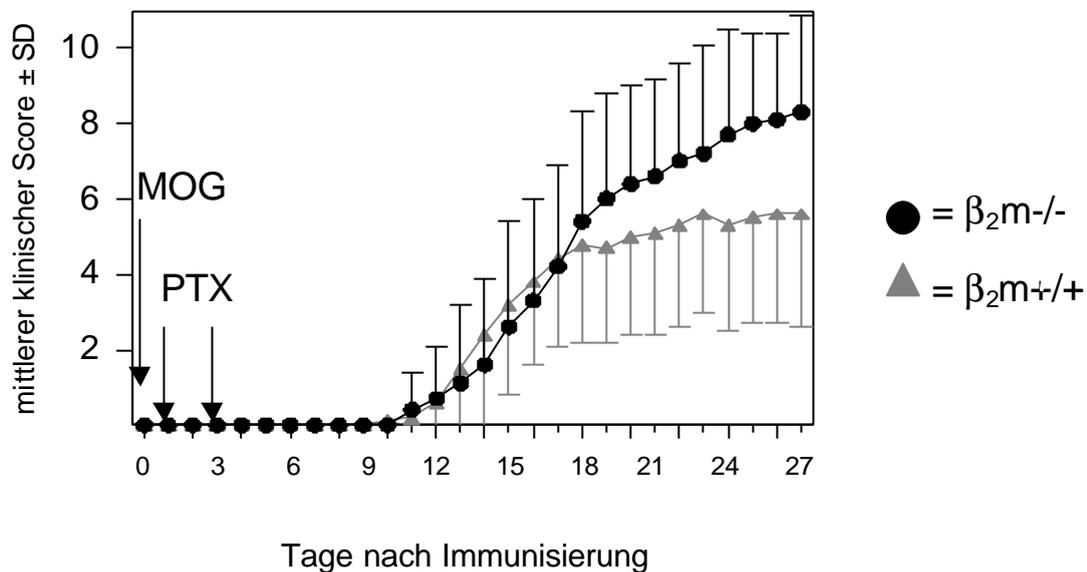


Abbildung 1: Krankheitsverlauf der MOG₃₅₋₅₅ – EAE, Mittelwerte aus 3 Experimenten mit 17 $^{-/-}$ Tieren und 21 $^{+/+}$ Tieren \pm SD, Tag 27 $p = 0,032$

Im Verlauf der MOG₃₅₋₅₅ – EAE entwickelten die β_2m knockout Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren schwerere Krankheitssymptome (Abb.1). Die verstorbenen Tiere wurden ab dem Tag des Todes mit einem Score von 10 bewertet. Insgesamt wurden Mäuse aus drei verschiedenen, unter gleichen Bedingungen durchgeführten Experimenten zusammengenommen, so dass sich eine Gesamtzahl von 17 knockout- und 21 Kontrolltieren ergab.

Maximum der Erkrankung

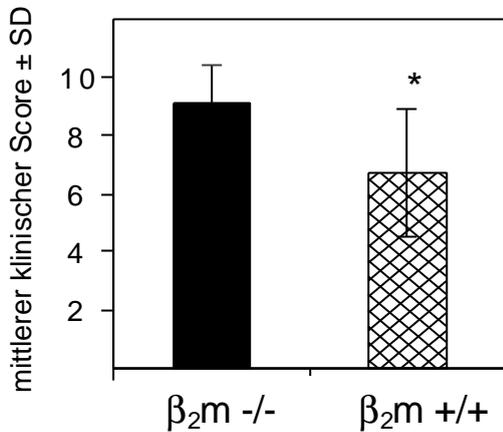


Abbildung 2:

Mittelwerte des maximalen Krankheitsgrades der einzelnen Tiere,
-/- : $9,1 \pm 1,3$ SD ; insgesamt 17 Tiere
+/: $6,7 \pm 2,2$ SD; insgesamt 21 Tiere
 $p = 0,01$

Der durchschnittliche maximale Krankheitswert (Abb. 2) der $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse, lag signifikant über dem Wert der Kontrolltiere. Anders als bei dem oben dargestellten Krankheitsverlauf, sind die Unterschiede in der Krankheitsausprägung zwischen den beiden Tiergruppen hier sehr deutlich zu erkennen. Dies rührt daher, dass die einzelnen Tiere meist nicht gleichzeitig den maximalen Erkrankungswert zeigen, sondern dies zeitlich versetzt erfolgt. So sind die Mittelwerte im Verlauf stets geringer als der durchschnittliche maximale Krankheitsgrad.

Mortalität

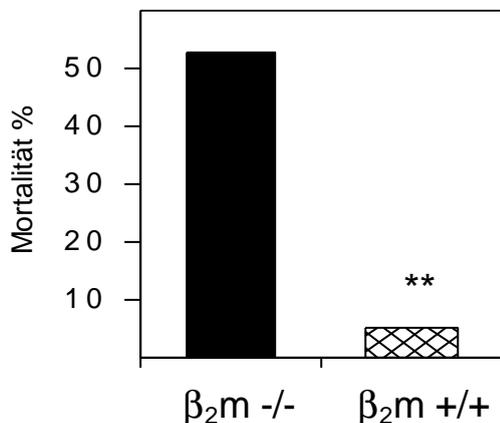


Abbildung 3:

9/17 (53%) $\beta_2m^{-/-}$ und
1/21 (5%) $\beta_2m^{+/+}$ Mäusen
verstorben;
 $p = 0,001$

Die schwere Krankheitsausprägung der MHC I defizienten $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse wird auch durch die Sterblichkeitsrate verdeutlicht (Abb. 3). Insgesamt verstarben knapp über die Hälfte der knockout Mäuse an der Krankheit oder mußten entsprechend den Regularien des Tierschutzgesetzes aus dem Versuch genommen werden. Eine Beobachtung der Tiere bis in die späte chronische Phase, war auf Grund der schweren Ausprägung der Erkrankung nicht möglich, daher können keine Aussagen über Schubrate oder chronischen Verlauf gemacht werden.

Inzidenz

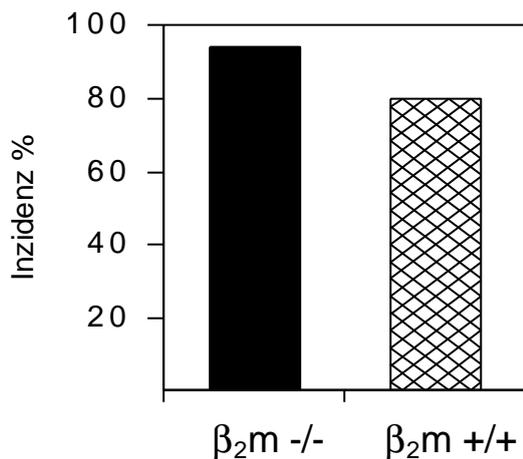


Abbildung 4: Nach Immunisierung mit MOG erkrankten 16 von 17 (93%) $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse sowie 17 von 21 (81%) $\beta_2m^{+/+}$ Mäusen; $p = 0,236$

Krankheitsbeginn

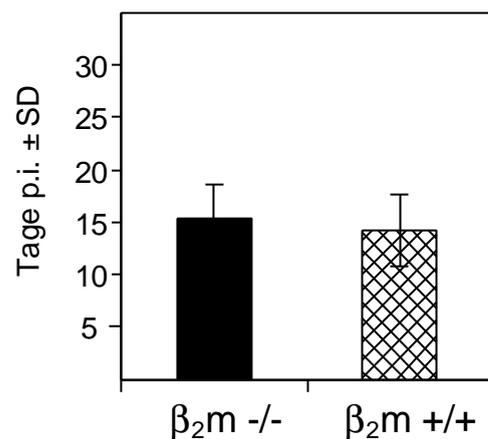


Abbildung 5:
 $\beta_2m^{-/-}$: Tag 15,3 ± 3,3 SD
 $\beta_2m^{+/+}$: Tag 14,2 ± 3,4 SD;
 $p = 0,16$

Hinsichtlich der EAE-Inzidenz ergab sich zwischen den Tiergruppen kein signifikanter Unterschied (Abb. 4). Auch der Zeitpunkt des Krankheitsbeginns war annähernd gleich (Abb. 5).

3.2. rMBP – EAE: b₂m -/- Mäuse sind stärker betroffen als

Kontrolltiere

	maximaler Score (MW ± SD)	Mortalität	Inzidenz	Krankheitsbeginn (Tag; MW ± SD)
3 Tiere rMBP: 200µg Tag 0; PTX : 400ng Tag 1+3	1	0/3	1/3	29
4 Tiere rMBP :200µg Tag 0 + 15; PTX : 400ng Tag 1 + 3	4	1/4	1/4	13
3 Tiere rMBP: 200µg Tag 0 + 15, PTX: 400ng Tag 1 + 3 und Tag 16 + 18	7,3 ± 2,5	1/3	3/3	27,7 ± 8,9

Tabelle 1: Immunisierungsprotokolle der rMBP – EAE mit C57BL/6 Mäusen

Zur Optimierung des Verlaufs der mit rMBP induzierten EAE in C57BL/6 Mäusen, wurde ein Vorversuch an Wildtypmice mit unterschiedlichen Immunisierungsprotokollen durchgeführt (Tab. 1).

Mit 200 µg rMBP und 400 ng PTX an Tag 1 und 3, ließ sich keine EAE in den C57BL/6 Mäusen auslösen. Nur eine Maus zeigte leichte Symptomatik, welche nicht höher als mit einem Grad von 1 (reduzierter Tonus der Schwanzspitze) zu bewerten war. Eine zusätzliche Immunisierung an Tag 15 mit weiteren 200 µg rMBP führte nur mit nochmaliger Gabe von PTX an Tag 16 und 18 zu Krankheitssymptomen bei allen Tieren. Sie erlangten in dieser Gruppe einen

durchschnittlichen Krankheitsgrad von 7 (schwere Paraparese, Paraplegie). Um bei C57BL/6 Mäusen eine ausreichend schwere EAE mit rMBP auszulösen, ist also eine zusätzliche Verabreichung von 200 µg rMBP an Tag 15 plus 400 ng PTX an Tag 16 und 18 notwendig. Zur Beurteilung der chronischen Phase wurden die Tiere bis maximal Tag 60 beobachtet. Ungefähr ab Tag 40 waren die Mäuse klinisch wieder unauffällig, es ergaben sich keine weiteren Schübe, die EAE verlief monophasisch.

Krankheitsverlauf

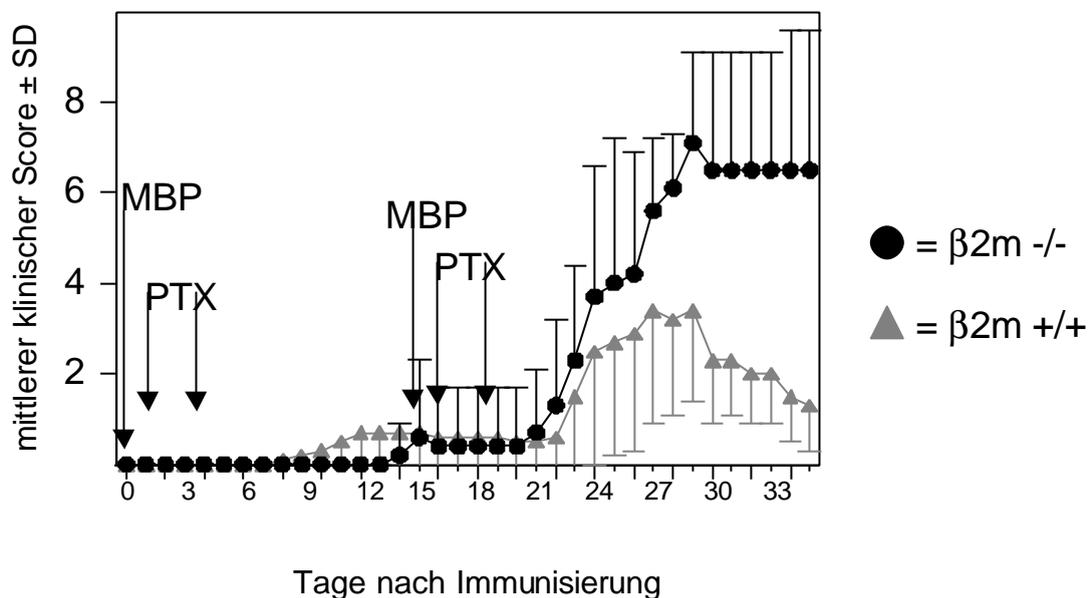


Abbildung 6: Krankheitsverlauf der rMBP – EAE, Mittelwerte aus 3 Experimenten mit insgesamt 12 $-/-$ und 16 $+/+$ Tieren \pm SD; Tag 29 $p = 0,002$

Auch bei der mit rMBP induzierten EAE zeigte sich bei den knockout Mäusen ein schwererer Krankheitsverlauf (Abb. 6). Es wurden ebenfalls drei verschiedene, unter denselben Bedingungen durchgeführte, Experimente zusammen ausgewertet, mit einer Gesamtzahl von 12 $-/-$ und 16 $+/+$ Mäusen. Verstorbene Tiere erhielten ab dem Tag des Todes den Score 10.

Maximum der Erkrankung

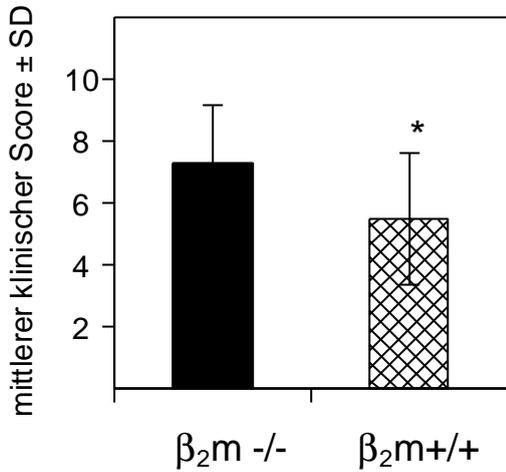


Abbildung 7:

Mittelwerte des maximalen Krankheitsgrades der einzelnen Tiere,
-/- : $7,3 \pm 1,9$ SD ; insg. 12 Tiere
+/+ : $5,5 \pm 2,1$ SD; insg. 16 Tiere
 $p = 0,05$

Der durchschnittliche maximale Krankheitsgrad der $\beta_2m^{-/-}$ Tiere lag signifikant über dem Wert der Kontrolltiere (Abb. 7).

Insgesamt löste die Immunisierung mit rMBP bei den β_2 Mikroglobulin knockout Mäusen und den C57BL/6 Kontrolltieren eine mildere klinische Symptomatik aus, als die aktive EAE mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid.

Mortalität

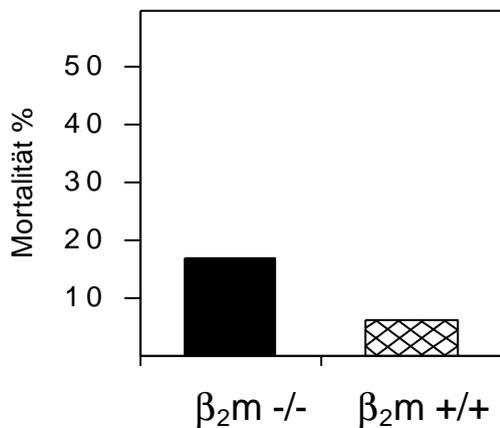


Abbildung 8:

2/12 (16%) $\beta_2m^{-/-}$ und
1/16 (6%) $\beta_2m^{+/+}$ Mäusen
verstorben;
 $p = 0,37$

Passend zur milderer Ausprägung der klinischen Symptomatik der rMBP – EAE ist hier auch die Sterblichkeitsrate der Mäuse insgesamt geringer als bei der MOG₃₅₋₅₅ – EAE (Abb. 8).

Inzidenz

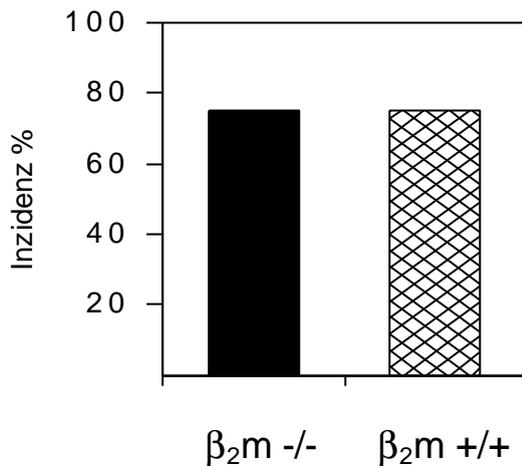


Abbildung 9: Nach Immunisierung mit rMBP erkrankten 9/12 (75%) $\beta_2m^{-/-}$ und 12/16 (75%) $\beta_2m^{+/-}$ Mäuse, $p = 1$

Krankheitsbeginn

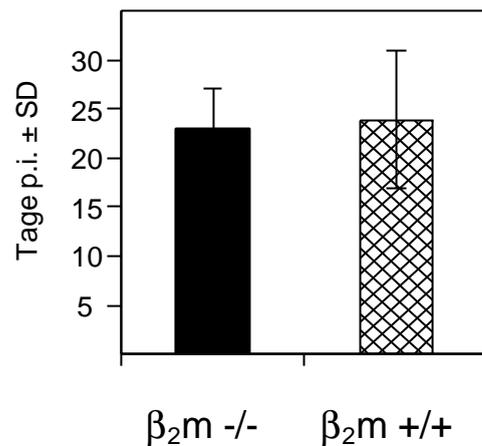


Abbildung 10:
 $\beta_2m^{-/-}$: Tag 22,9 ± 4,1 SD;
 $\beta_2m^{+/-}$: Tag 23,9 ± 7,1 SD;
 $p = 0,54$

Die Erkrankungsrate liegt bei beiden Tiergruppen bei 75 % (Abb. 9)

Auch hinsichtlich des Zeitpunkts des Krankheitsbeginns fand sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 10).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die EAE in beiden Modellen bei den MHC I defizienten, β_2m knockout Mäusen schwerer verlief, mit erhöhter Sterblichkeitsrate. Kein Unterschied fand sich hinsichtlich Erkrankungshäufigkeit und Zeitpunkt des Krankheitsbeginns. Die rMBP – EAE zeigte allgemein eine mildere Krankheitssymptomatik als die MOG₃₅₋₅₅ – EAE.

3.3. rhMOG – EAE: $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse sind stärker betroffen

	$\beta_2m^{-/-}$	$\beta_2m^{+/+}$
Maximaler Score (MW \pm SD)	6,8 \pm 2,2 p = 0,45	5,8 \pm 1,7
Mortalität	0/7	0/7
Inzidenz	6/7 (86%) p = 0,24	4/7 (57%)
Beginn der Erkrankung (Tag; MW \pm SD)	14,5 \pm 1,8	14,8 \pm 3,0

Tabelle 2: Ergebnisse nach Immunisierung mit rekombinantem humanem MOG, MW von 6 $\beta_2m^{-/-}$ und 4 $\beta_2m^{+/+}$ Tieren \pm SD

Ähnlich wie bei der MOG₃₅₋₅₅ und rMBP – EAE, erkrankten die $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse nach Immunisierung mit rekombinantem humanem MOG stärker als die Kontrolltiere (Tab. 2). Die Symptomatik war allgemein etwas geringer ausgeprägt als nach Verabreichung der anderen Antigene, was auch durch die Mortalität (keine Ausfälle in beiden Gruppen) verdeutlicht wird. Die Inzidenz war bei den $\beta_2m^{-/-}$ Mäusen im Vergleich den Kontrolltiere erhöht, bezüglich Beginn der Erkrankung zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

3.4. Histologie: Unterschiede in entzündlicher Infiltration und vermehrter axonaler Schaden bei β_2m $-/-$ Mäusen

Zur histologischen Bewertung der Entzündungsprozesse wurde den Mäusen zum Zeitpunkt der maximalen Krankheitsausprägung (MOG₃₅₋₅₅ - EAE Tag 27 p.i.; rMBP - EAE Tag 30 p.i.) das perfusionsfixierte Rückenmark entnommen, 5 μ m dicke Paraffinschnitte angefertigt und diese mit unterschiedlichen Färbemethoden untersucht.

3.4.1 Perivaskuläre und parenchymale Infiltrate

3.4.1.1. Inflammatorischer Index

H&E – Färbung

MOG₃₅₋₅₅ – EAE

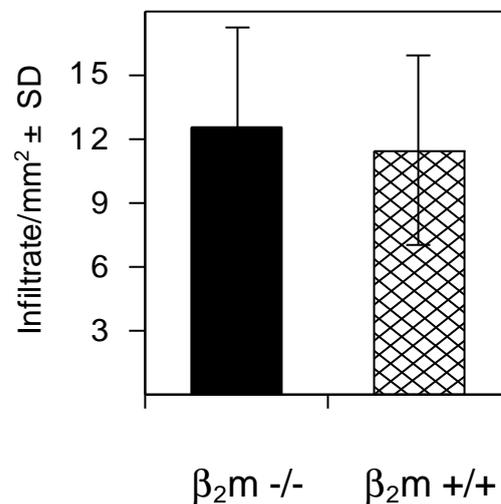
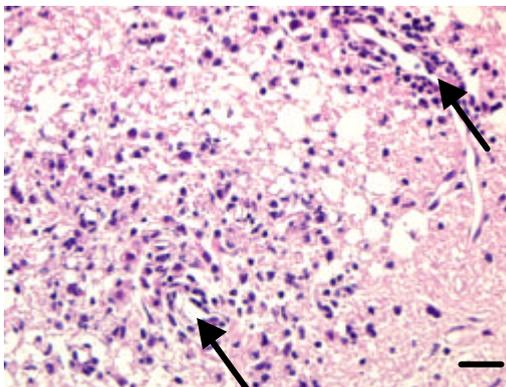


Abbildung 11: links: repräsentativer H&E gefärbter zervikaler Rückenmarksquerschnitt einer mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten knockout Maus; Maßstab = 50 μ m
rechts: Auszählung der Infiltrate pro mm² auf 8-10 unabhängigen Rückenmarksebenen; β_2m $-/-$: 12,6 ± 4,7 SD und β_2m $+/+$: 11,5 ± 4,4 SD Infiltrate/mm²; p = 0,10
Pfeile: perivaskuläre Infiltrate

Die Färbung des zervikalen Rückenmarksschnitt einer $\beta_2m^{-/-}$ Maus (Abb. 11 links) mit Hämatoxylin und Eosin zeigt massive perivaskuläre und parenchymale Entzündungsinfiltrate. Zur Auswertung der Anzahl an Infiltraten pro mm^2 , wurde gefärbtes Gewebe von 4 $\beta_2m^{-/-}$ und 5 $\beta_2m^{+/+}$ Mäusen eines Experimentes verwendet, und pro Tier 8 bis 10 voneinander unabhängige, gesamte Rückenmarksquerschnitte gezählt (Abb. 11 rechts).

Nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid fand sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Infiltratzahl zwischen den Tiergruppen. Es war lediglich eine Tendenz der $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse zu verstärkter Inflammation zu erkennen.

rMBP – EAE

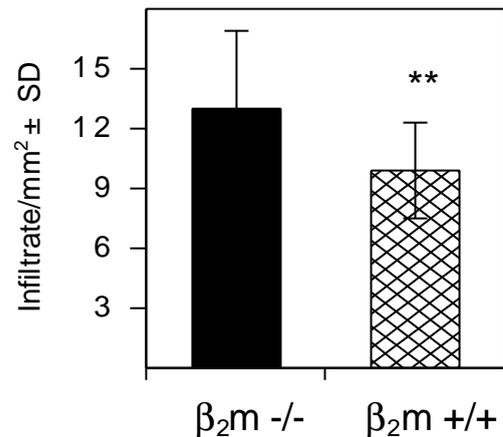
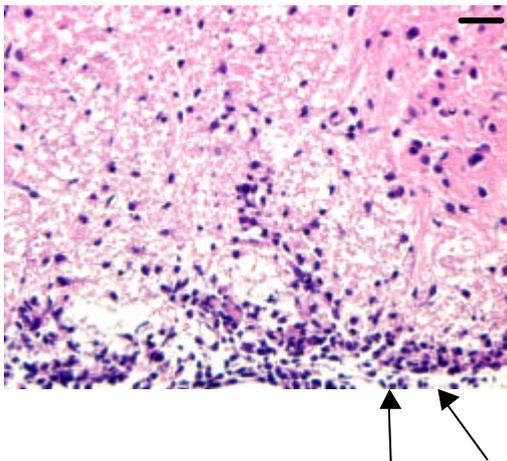


Abbildung 12: links: repräsentativer H&E gefärbter lumbaler Rückenmarksquerschnitt einer mit rMBP immunisierten knockout Maus, Maßstab = 50 μm
rechts: Auszählung der Infiltrate pro mm^2 auf 8-10 unabhängigen Rückenmarksebenen; $\beta_2m^{-/-}$: $13,0 \pm 3,9$ SD und $\beta_2m^{+/+}$: $9,9 \pm 2,4$ SD Infiltrate/ mm^2 ; $p = 0,008$.
Pfeile: subpiale Infiltrate

Auch der Rückenmarksquerschnitt einer mit rMBP immunisierten knockout Maus zeigt deutliche perivaskuläre und subpiale Infiltrate (Abb. 12 links).

Die Auswertung des inflammatorischen Index erfolgte hier genauso wie bei der MOG₃₅₋₅₅ – EAE auf 8 bis 10 unabhängigen Rückenmarksebenen (Abb 12 rechts). 4 $\beta_2m^{-/-}$ und 4 $\beta_2m^{+/+}$ Tiere aus einem Experiment wurden verwendet. Die Infiltratdichte war bei den $\beta_2m^{-/-}$ Mäusen signifikant erhöht.

3.4.1.2. T-Zellinfiltration

CD3 Färbung

MOG₃₅₋₅₅ – EAE

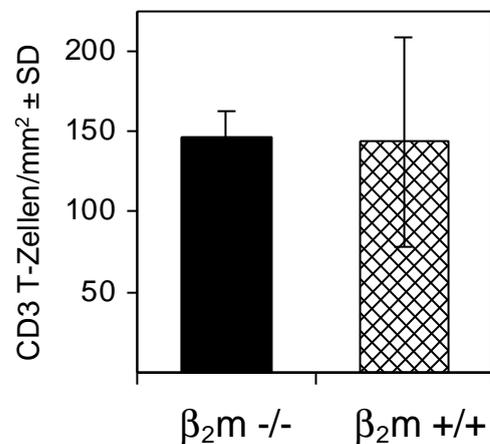
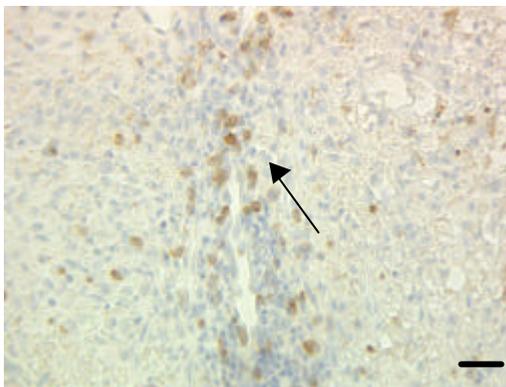


Abbildung 13: links: repräsentativer, für CD3 T-Zellen gefärbter Rückenmarksquerschnitt einer $\beta_2m^{-/-}$ Maus, Maßstab = 50 μm ; rechts: Auszählung der CD3 T-Zellen pro mm^2 in 250er Vergrößerung auf jeweils einem repräsentativen zervikalen, thorakalen und lumbalen Rückenmarksschnitt in 10 definierten Bereichen. $\beta_2m^{-/-}$: $146,8 \pm 15,3$ SD, $\beta_2m^{+/+}$: $143,5 \pm 65,5$ SD Zellen/ mm^2 , $p = 0,46$. Pfeil: perivaskuläre CD3 T-Zellen

Zur weiteren Differenzierung der infiltrierenden Immunzellen wurden T-Zellen anhand immunohistochemischer Detektion von unterschiedlichen Oberflächenmarkern, dargestellt. Die CD3 Färbung eines Rückenmarksschnittes einer mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus zeigte moderate, vor allem perivaskulär angeordnete Infiltration von CD3 T-Zellen (Abb. 13 links). Zur Auswertung der Anzahl von CD3 T-Zellen/ mm^2 wurden pro Tier jeweils 10 definierte Areale eines repräsentativen zervikalen

und lumbalen Gewebsschnitt in 250er Vergrößerung ausgezählt (Abb. 13 rechts). Es wurde Gewebe von 3 $\beta_2m^{-/-}$ und 5 $\beta_2m^{+/+}$ Tieren aus einem Experiment verwendet. Die Dichte an infiltrierenden CD3 T-Zellen/mm² war bei beiden Tiergruppen nahezu gleich.

rMBP-EAE

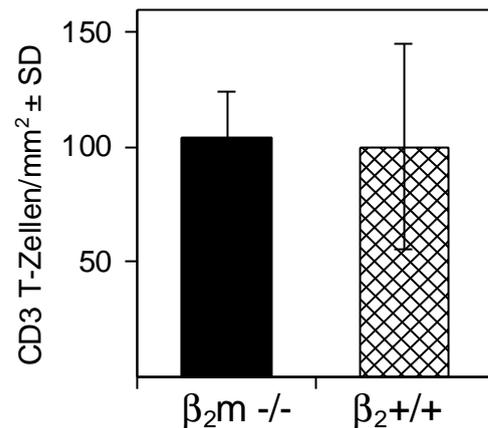
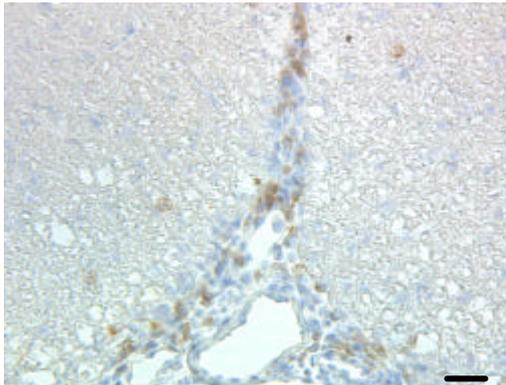


Abbildung 14: links: repräsentativer, auf CD3 T-Zellen gefärbter Rückenmarksquerschnitt einer $\beta_2m^{-/-}$ Maus, Maßstab = 50 μ m; rechts: Auszählung der CD3 T-Zellen pro mm² in 250er Vergrößerung auf jeweils einem repräsentativen zervikalen, thorakalen und lumbalen Rückenmarksschnitt in 10 definierten Bereichen. $\beta_2m^{-/-}$: 104,4 ± 19,9 SD; $\beta_2m^{+/+}$: 100,4 ± 45,0 SD Zellen/mm²; p = 0,18

Die Abbildung 14 (links) zeigt ebenfalls vor allem perivaskulär angeordnete, CD3 T-Zellen einer repräsentativ erkrankten, mit rMBP immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus. Die Auswertung der CD3 T-Zellen/mm² erfolgte wie bei der MOG₃₅₋₅₅ – EAE, hier mit 4 $\beta_2m^{-/-}$ und 4 $\beta_2m^{+/+}$ Mäusen eines Experimentes (Abb. 14 rechts). Auch hier war die Dichte an infiltrierenden CD3 T-Zellen bei beiden Tiergruppen nahezu gleich.

In beiden Versuchsprotokollen fand sich demnach, trotz fehlender CD8 T-Zellen bei den knockout Mäusen, kein Unterschied in der Anzahl an infiltrierenden CD3 T-Zellen. Zur weiteren Differenzierung der CD3 T-Zellen in CD4 und CD8 T-Zellen wurden anschließend immunhistochemische Färbungen mit CD4 und CD8 Antikörpern durchgeführt.

CD4 Färbung

MOG₃₅₋₅₅ – EAE

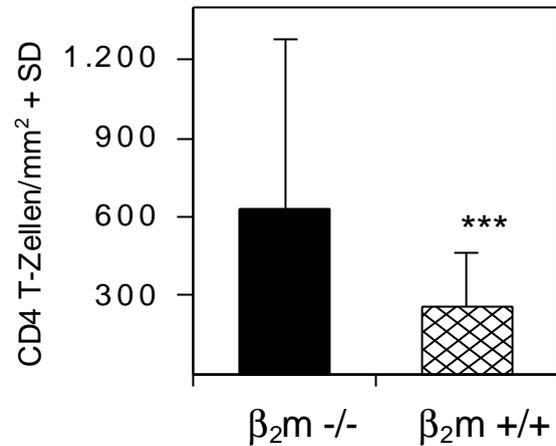
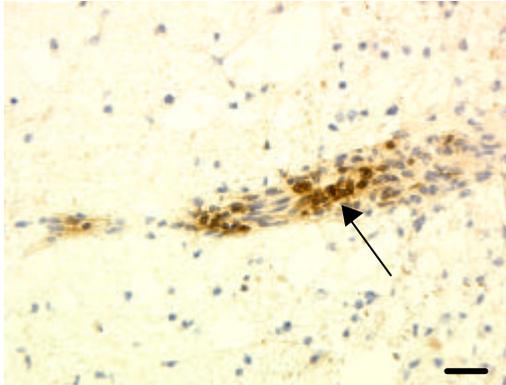


Abbildung 15: links: repräsentativer, für CD4 T-Zellen gefärbter Rückenmarksschnitt einer $\beta_2m^{-/-}$ Maus; Maßstab = 50 μm ; rechts: Auszählung der CD4 T-Zellen pro mm^2 wie bei CD3 T- Zellen beschrieben

$\beta_2m^{-/-}$: $628,4 \pm 647,6$ SD, $\beta_2m^{+/+}$: $254,8 \pm 205,8$ SD CD4 T-Zellen/ mm^2 , $p < 0,001$
Pfeil: perivaskulär angeordnete CD4 T-Zellen

Da die Detektion von CD4 und CD-8 T-Zellen nur anhand von Standardgefrierschnitten möglich ist, wurde ein weiteres Tierexperiment zur direkten Darstellung dieser Zellen durchgeführt. Zunächst wurde auch hier auf CD3 T-Zellen gefärbt, mit demselben Ergebnis wie bei den Paraffinschnitten. Es fand sich kein Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid (532.7 ± 412.3 SD bei $\beta_2m^{-/-}$ und 508.1 ± 381.5 SD CD3 T-Zellen/ mm^2 bei den Kontrollen).

Die Abbildung 15 (links) zeigt vor allem perivaskulär angeordnete CD4 T-Zellen einer repräsentativen $\beta_2m^{-/-}$ Maus. Obwohl die Anzahl der CD4 T-Zellen stark zwischen den einzelnen Tieren und den verschiedenen Rückenmarksebenen variierte, war der durchschnittliche Wert der Zellen/ mm^2 bei den knockout Tieren signifikant erhöht (Abb 15 rechts).

CD-8 Färbung

MOG₃₅₋₅₅ – EAE

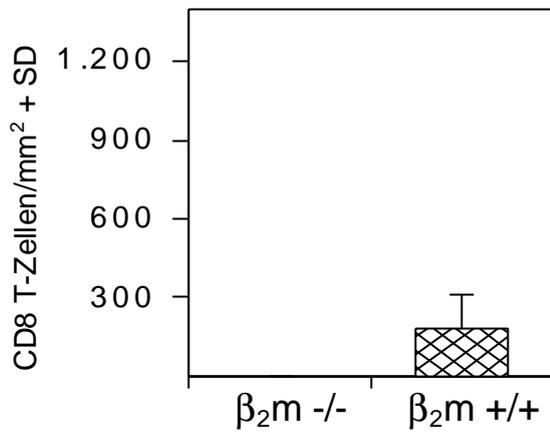


Abbildung 16:

Auszählung CD8 T-Zellen/mm²
wie bei CD4 Färbung

$\beta_2m^{+/+}$: 182,5 ± 129,6 SD

CD8 T-Zellen/mm²

Die CD8 Färbung wurde ebenfalls an Standardgefrierschnitten durchgeführt.

Bei den $\beta_2m^{-/-}$ Mäusen fanden sich wie erwartet keine CD8 T-Zellen (Abb. 16).

Das Verhältnis von CD4 zu CD8 T-Zellen lag bei den Kontrolltieren bei ca. 1:1.

3.4.1.3. Makrophageninfiltration

Mac-3 – Färbung

MOG 35-55 – EAE

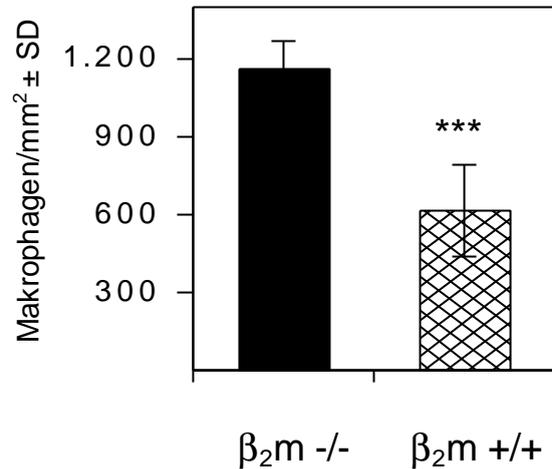
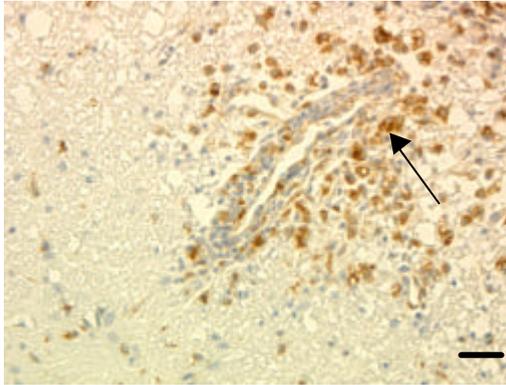


Abbildung 17: links: repräsentativer, auf Makrophagen und Mikroglia gefärbter Rückenmarksschnitt einer $\beta_2m^{-/-}$ Maus, , Maßstab = 50 μm ; rechts: Auszählung der Mac-3 Zellen/mm² wie bei CD3 Färbung
 $\beta_2m^{-/-}$: 1164,2 ± 107,6 SD, $\beta_2m^{+/+}$: 616,9 ± 177,5 SD Mac-3-Zellen/mm, $p < 0,001$.
Pfeil: perivaskuläre Mac-3 Zellen

Makrophagen sind die vorherrschenden Immunzellen in den meisten EAE Läsionen. Paraffinschnitte von 4 $\beta_2m^{-/-}$ und 5 $\beta_2m^{+/+}$ Tieren eines Versuches wurden auf Makrophagen und Mikroglia mittels Immunhistochemie für Mac-3 mit einem Mac-3 Antikörper gefärbt. Die Abbildung 17 (links) zeigt Mac-3 positive Zellen im repräsentativen Rückenmarksquerschnitt einer mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus. Die Infiltration von Mac-3 positiven Makrophagen und Mikroglia war bei den knockout Mäusen signifikant höher als bei den Kontrollen (Abb. 17 rechts).

Vergleicht man die Menge der infiltrierenden Immunzellen miteinander, so finden sich bei den mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Tieren in etwa achtmal mehr Makrophagen als CD3 T-Zellen in den Läsionen.

rMBP – EAE

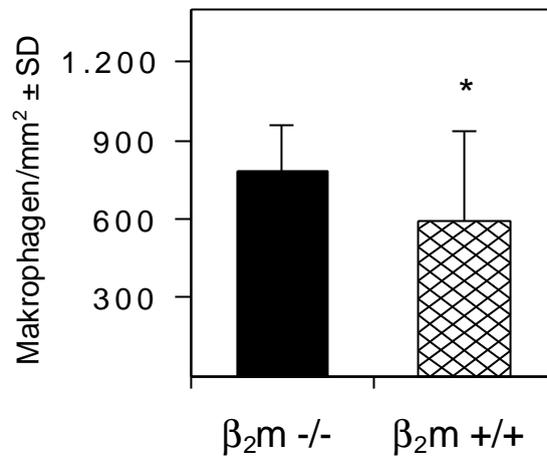
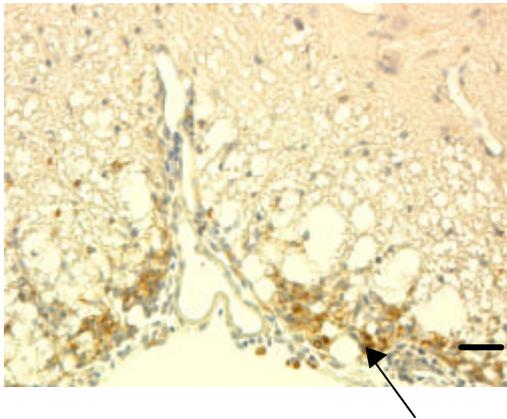


Abbildung 18: links: repräsentativer, auf Makrophagen und Mikroglia gefärbter Rückenmarksschnitt einer $\beta_2m^{-/-}$ Maus, Maßstab = 50 μm ; links: Auszählung der Mac-3⁺ Zellen/mm² wie bei CD3 Färbung
 $\beta_2m^{-/-}$: 782 ± 178 SD; $\beta_2m^{+/+}$: 595 ± 343 SD Mac-3⁺ Zellen/mm², p = 0,03, Pfeil: subpiale Mac-3 Zellen

Der repräsentative Rückenmarksquerschnitt einer mit rMBP immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus, zeigt subpial und perivaskulär liegende Makrophagen und Mikroglia nach Färbung mit einem Mac-3 Antikörper (Abb. 18 links).

Auch nach Induktion einer EAE mit rMBP fand sich in den $\beta_2m^{-/-}$ Tieren eine signifikant erhöhte Makrophagen- und Mikrogliafiltration. (Abb. 18 rechts).

Die schwerere symptomatische Ausprägung der EAE der mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Mäusen wurde somit von einer erhöhten Anzahl an infiltrierenden Mac-3 positiven Makrophagen und Mikroglia und einer qualitativ unterschiedlichen T-Zellinfiltration begleitet. Bei den mit rMBP immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Tieren fand sich ebenfalls eine vermehrte Makrophagen und Mikrogliafiltration.

3.4.2 Demyelinisierung und axonaler Schaden

Zur Quantifizierung der Demyelinisierung und des axonalen Schadens wurde eine Luxol-Fast-Blue – Färbung, sowie eine APP – Färbung durchgeführt.

3.4.2.1. LFB – Färbung

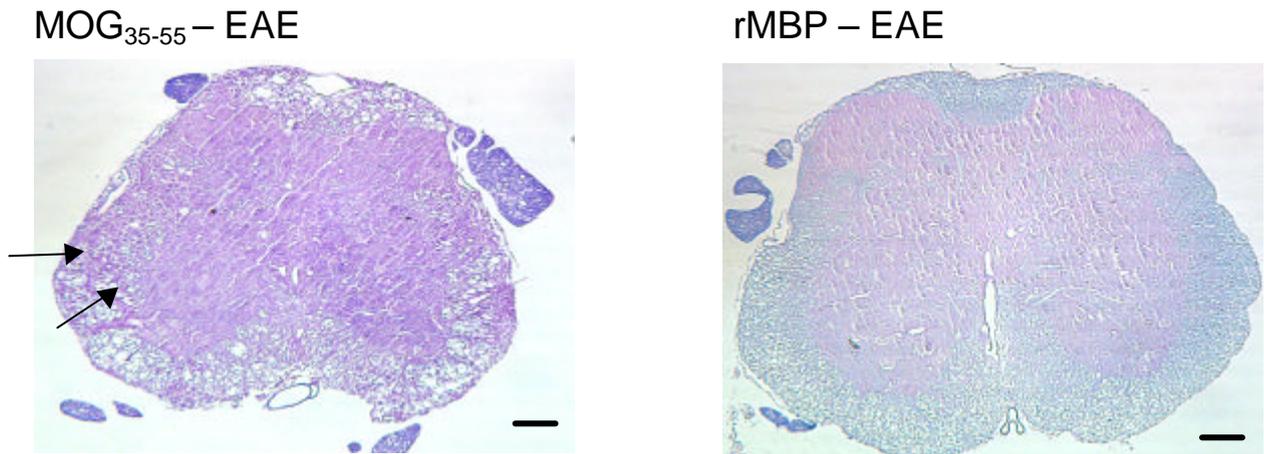


Abbildung 19: links: repräsentativer, lumbosakraler LFB-gefärbter Rückenmarksquerschnitt einer mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus, rechts: repräsentativer, lumbosakraler, LFB-gefärbter Rückenmarksquerschnitt einer mit rMBP immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus, Maßstab: je 200 μm ; Pfeile: demyelinisierte Areale

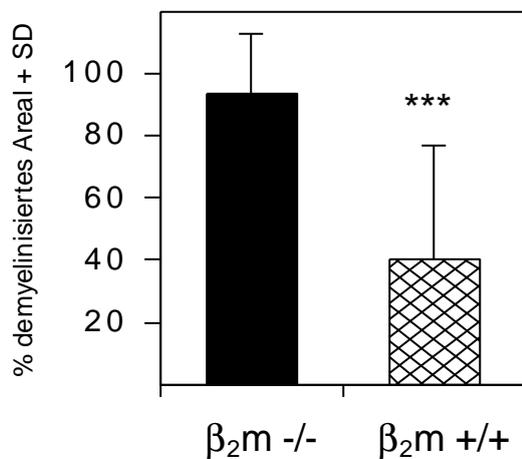


Abbildung 20: mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierte Tiere; $\beta_2m^{-/-}$: 93.6% + 19.2 SD; $\beta_2m^{+/+}$: 40.5% + 36.4 SD demyelinisierte Areale in % der gesamten weißen Substanz, $p < 0.001$

Der Rückenmarksquerschnitt einer mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus zeigt massive Demyelinisierung im Bereich der gesamten weißen Substanz (Abb. 19 links). Die demyelinisierten Bereiche wurden mit den Mac-3 positiven Arealen des Gewebes verglichen, da Makrophagen eine wichtige Effektorrolle bei der Schädigung des Myelins zugesprochen wird (Brück et al., 1995; 1996). Beide Bereiche korrelierten gut miteinander. $\beta_2m^{-/-}$ mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid immunisierte Tiere zeigten weitaus mehr demyelinisierte Areale als die Kontrolltiere (Abb. 20).

Bei den mit rMBP immunisierten Tieren fand sich kaum Demyelinisierung (Abb. 19 rechts), eine statistische Auswertung wurde deshalb hier nicht durchgeführt.

3.4.2.2. APP – Färbung

MOG₃₅₋₅₅ – EAE

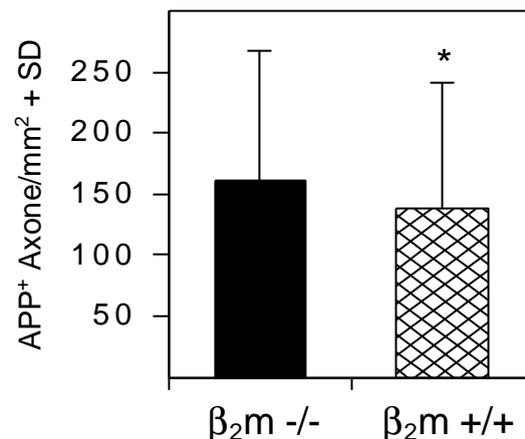
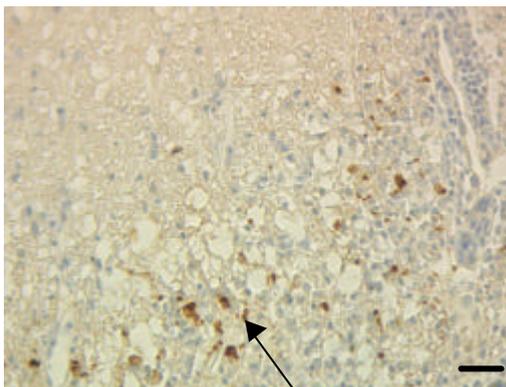


Abbildung 21: links: repräsentativer, für APP gefärbter Rückenmarksschnitt einer mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus, Maßstab 200 μ m; rechts: Auszählung der APP⁺ Axone/mm² in je 3 demyelinisierten Arealen von 8 bis 10 unabhängigen Rückenmarksebenen. $\beta_2m^{-/-}$: 161 ± 106 SD; $\beta_2m^{+/+}$: 138 ± 103 SD APP Axonen/mm², p = 0,037; Pfeil: APP positive Axone

Die Abbildung 21 links zeigt APP positive Axone einer mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus. Bei den knockout Mäusen fand sich eine signifikant erhöhte axonale Schädigung (Abb. 21 rechts). APP positive Axone wurden pro Tier in je drei, durch die LFB-Färbung festgelegten, demyelinisierten Arealen, von insgesamt 8 bis 10 unabhängigen Rückenmarksebenen, in 400er

Vergrößerung gezählt. Es wurde Gewebe von 4 $\beta_2m^{-/-}$ und 4 $\beta_2m^{+/+}$ Tieren aus einem Experiment verwendet.

rMBP – EAE

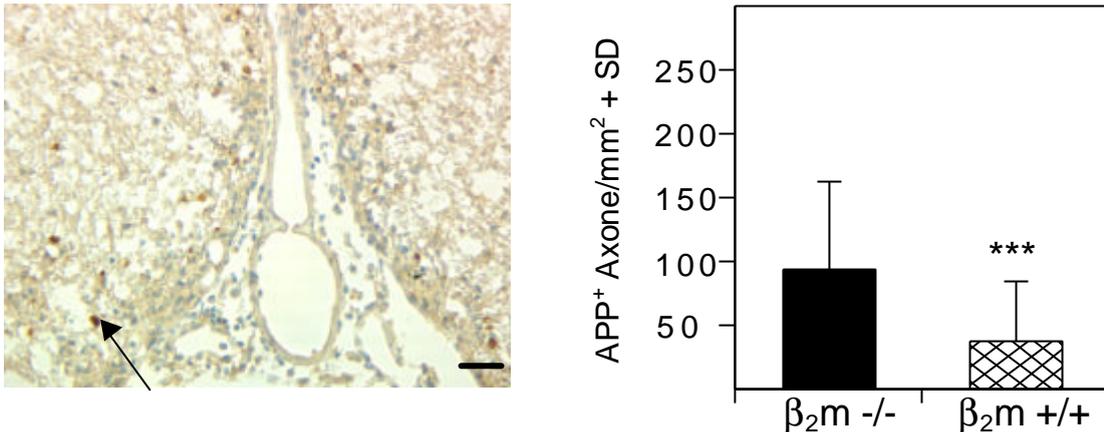


Abbildung 22: links: repräsentativer, mittels APP-Immunhistochemie gefärbter Rückenmarksschnitt einer mit rMBP immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus, Maßstab 200 μ m; rechts: Auswertung der APP⁺ Axone/mm² wie bei MOG₃₅₋₅₅ – EAE. $\beta_2m^{-/-}$: 94,5 ± 68 SD, $\beta_2m^{+/+}$: 38,4 ± 45,8 SD APP Axone/mm², p < 0,001. Pfeil: APP positives Axon

Der Rückenmarksquerschnitt einer mit rMBP immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus zeigt absolut gesehen etwas weniger APP positive Axone, als der Gewebsschnitt der mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten $\beta_2m^{-/-}$ Maus (Abb.22 links). Insgesamt fanden sich auch nach Immunisierung mit rMBP signifikant mehr geschädigte Axone bei den $\beta_2m^{-/-}$ Tieren.

Die bisherigen Ergebnisse zusammengefasst:

Im Vergleich zu den C57BL/6 Kontrolltieren zeigen MHC I defiziente Mäuse sowohl nach Induktion einer EAE mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid als auch rMBP einen schwereren Krankheitsverlauf, der von erhöhter Makrophageninfiltration und vermehrter axonaler Schädigung begleitet wird. Bei mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid immunisierten Mäusen wurde außerdem eine erhöhte CD4 T-Zellinfiltration und verstärkte Myelinschädigung nachgewiesen.

3.5. Lymphozytenproliferationsassay: Kein Unterschied in Stimulierbarkeit und „Priming“ zwischen den Tiergruppen

Zur Überprüfung der Stimulierbarkeit und des spezifischen „Primings“ der Lymphozyten, wurden Proliferationsversuche mit Primärzellkulturen aus inguinalen und poplitealen Lymphknoten der mit MOG₃₅₋₅₅ und rMBP immunisierten Mäuse durchgeführt.

Proliferationsassay

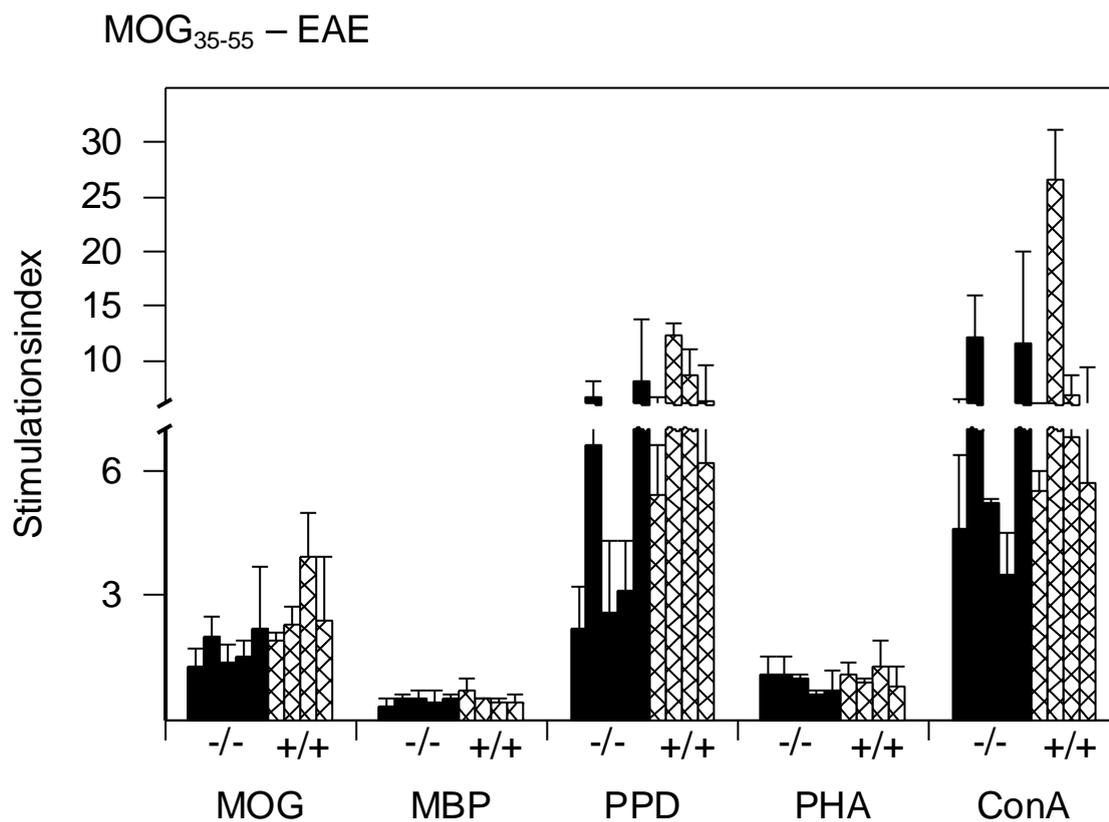


Abbildung 23: Proliferationsversuch MOG₃₅₋₅₅ - EAE mit MW aus Triplettkulturen von 5 $\beta 2m^{-/-}$ und 4 $\beta 2m^{+/+}$ Mäusen

Nach Stimulation des Lymphknoten-„Primäransatzes“ der mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten Tiere mit dem spezifischen Antigenen MOG₃₅₋₅₅, ergab sich hinsichtlich Proliferationsrate kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen. Eine stärkere Aktivierung der Immunzellen durch das im Vorfeld zur Immunisierung verabreichte MOG₃₅₋₅₅ gegenüber der Negativkontrolle mit rMBP ist deutlich erkennbar (Abb. 23). Auch nach Stimulation mit den Mitogenen PHA und ConA konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen beobachtet werden. Die klare Proliferation bzgl. des Antigens PPD zeigt, dass die Immunisierung an sich gut funktioniert hat.

rMBP – EAE

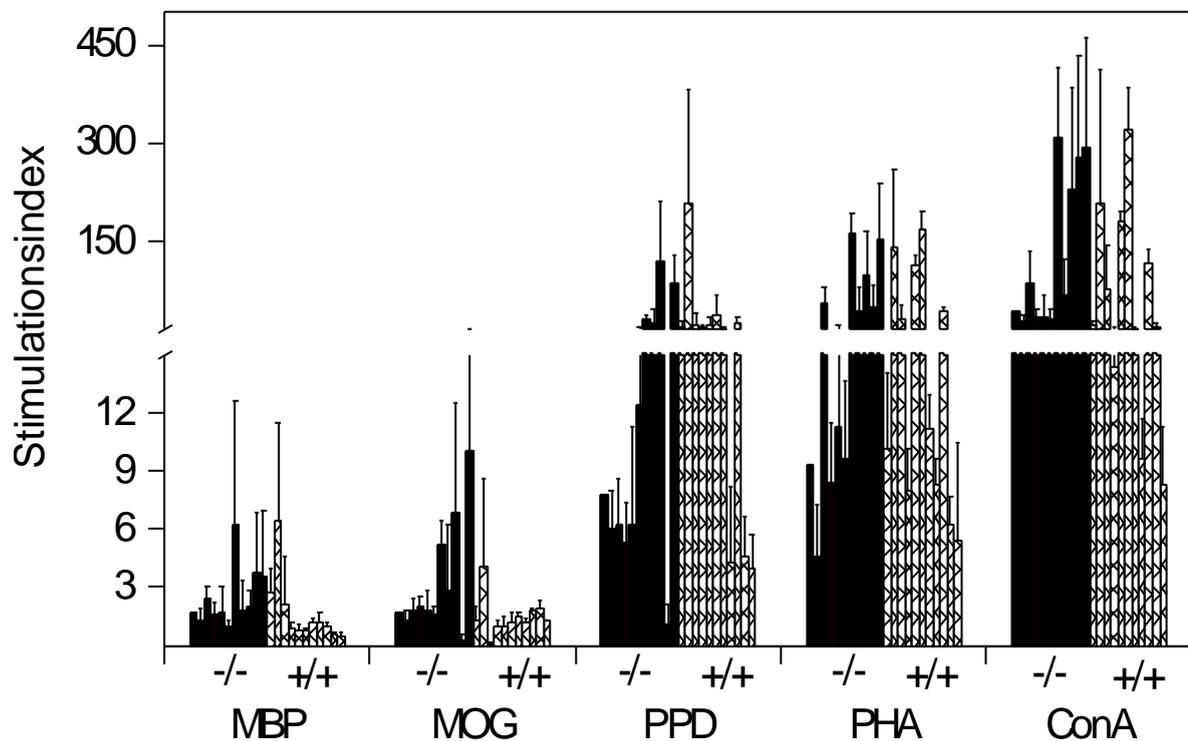


Abbildung 24: Proliferationsversuch rMBP – EAE mit MW aus Triplettkulturen von 12 $\beta 2m^{-/-}$ und 11 $\beta 2m^{+/+}$ Tieren

Auch bei den mit rMBP immunisierten Tieren fand sich nach spezifischer Stimulation der Lymphknotenpräparate mit rMBP kein signifikanter Unterschied zwischen den $\beta 2m^{-/-}$ und den $\beta 2m^{+/+}$ Mäusen. Die unspezifische Mitogenaktivierung mit PHA und ConA war ebenso bei beiden Tiergruppen vergleichbar und die Proliferationsrate nach Zugabe von PPD wiederum deutlich. Die annähernd mit MBP vergleichbare Proliferationsrate nach Zugabe des zur Immunisierung nicht verwendeten MOG Peptids zeigt, dass es im Rahmen des „primings“ durchaus zu unspezifischen Mitreaktionen kommen kann, ohne dass sich hierbei Unterschiede zwischen den Gruppen finden.

4. Diskussion

4.1. Klinischer Verlauf

Die klinische Beobachtung und statistische Auswertung des Verlaufs der EAE in β_2m knockout Mäusen und C57BL/6 Kontrolltieren ergab eine signifikant schwerere Erkrankung der β_2m defizienten Mäuse, verbunden mit erhöhter Mortalität. Dies stimmt weitestgehend mit den Ergebnissen von Studien, die die Rolle der NK-Zellen bei der EAE untersuchten, überein (Zhang et al., 1997; Fritz et al., 2001). Bezüglich Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns und Krankheitsprogression ergab sich in unseren Experimenten allerdings kein Unterschied zwischen den Tiergruppen. Das Fehlen von β_2 Mikroglobulin scheint hierfür im verwendeten Modell nicht ausschlaggebend zu sein.

4.2. Rolle der CD8 T-Zellen

β_2m knockout Mäuse weisen eine defekte CD8 T-Zellreifung und -funktionalität auf (Koller et al., 1990; Zijlstra et al., 1990). Die Induktion einer EAE in solchen Mäusen führte sowohl nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅, als auch mit rMBP zu einer verstärkten Erkrankung, mit (im Falle von MOG) einer erhöhten Mortalität. Diese Ergebnisse deuten auf eine regulatorische Rolle von CD8 positiven T-Zellen bei entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS hin. Entsprechende Beobachtungen konnten auch schon anhand der Untersuchung der EAE in CD8 knockout Mäusen oder nach antikörpervermittelter Depletion von CD8 T-Zellen gemacht werden. (Koh et al., 1992; Jiang et al., 1992). Das Fehlen von CD8 T-Zellen und MHC I Expression ging nach Auslösen sowohl einer MOG₃₅₋₅₅, als auch einer rMBP-EAE mit einer erhöhten Makrophagen und Mikroglia-infiltration einher. Desweiteren konnte bei der MOG₃₅₋₅₅-EAE eine relativ erhöhte CD4 T-Zellinfiltration nachgewiesen werden. Später durchgeführte Untersuchungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe, wiesen außerdem eine verstärkte IFN- γ Produktion bei mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten β_2m knockout Mäusen nach. Demnach ist hier von einer vermehrten Differenzierung der CD4 T-Zellen zum Subtyp T_H1 auszugehen. Dass regulatorische CD8 T-

Zellen nach Aktivierung durch CD4 T-Zellen, deren T_H Phänotyp in Richtung T_H2 Subgruppe verschoben können, ist beschrieben. Depletion von CD8 T-Zellen in Mäusen während der ersten EAE-Phase führte wiederum zu einer vermehrten Differenzierung der CD4 T-Zellen zum T_H1 Subtyp (Jiang et al., 2001). Auch in unserem Modell könnte auf Grund der fehlenden CD8 T-Zellen, eine gesteigerte Verschiebung der CD4 T-Zellen zum Subtyp T_H1 stattgefunden haben, was dann zur Verstärkung der Erkrankung, z. B. durch gesteigerte Makrophageninfiltration und -aktivität, führte.

Wie Eingangs bereits erwähnt, gibt es zunehmend Hinweise für eine pathogene Rolle der CD8 T-Zellen bei der MS Genese (Babbe et al., 2000; Jacobsen et al., 2002; Skulina et al., 2004; Medana et al., 2001). Erhöhte Anzahl von CD8 T-Zellen im Liquor von MS Patienten und in aktiv, demyelinisierenden MS-Läsionen sowie die nachgewiesene Zytotoxizität myelinspezifischer CD8 T-Zellen *in vitro*, lassen auf eine pathogene Funktion schließen. Ein Nachweis der Funktionalität der CD8 T-Zellen bei der MS *in vivo* steht jedoch noch aus. Am ehesten ist davon auszugehen, dass CD8 T-Zellen unterschiedliche Bedeutung in der Pathogenese chronisch demyelinisierender ZNS-Erkrankungen haben und sowohl regulatorische als auch pathogene Funktionen ausüben können. In unserem Modell der aktiv induzierten EAE in der β_2m knockout Maus mit MOG₃₅₋₅₅, rhMOG und rMBP, wiesen die Ergebnisse auf eine regulatorische Rolle der CD8 T-Zellen hin.

In manchen Mausstämmen, z. B. der KOD (H-2d) β_2m knockout Maus, ließen sich CD8 T-Zellen und geringfügige MHC I Expression induzieren (Cook et al., 1995). Die Differenzierungs- und Überlebensmechanismen in der Peripherie dieser CD8 T-Zellen, ihre Lebensspanne und Funktionalität sind jedoch noch unklar; sie scheinen in jedem Fall nicht mit dem CD8 Zellrepertoire in Wildtyp-Mäusen identisch zu sein. Die in unserer Studie verwendeten C57BL/6 (H-2b) β_2m knockout Mäuse, zeigten nach Färbung des Rückenmarks auf Oberflächenmarker von CD8 T-Zellen (s.o.) keine Färbereaktion. Auch die Durchführung einer FACS-Analyse, lieferte keine Hinweise auf CD8 T-Zellen in H-2b β_2m knockout Mäusen, so dass der Nachweis von CD8 und MHC I in β_2

Mikroglobulin defizienten Mäusen ein z.B. vom genetischen Hintergrund und gewählten Modell abhängiger Sonderfall zu sein scheint.

Darüberhinaus ist in β_2 Mikroglobulin defizienten Mäusen aufgrund der fehlenden MHC I Expression auch die NK-Zellfunktion beeinträchtigt (Raulet, 1994). Da NK-Zellen bei der EAE auch regulatorische Aufgaben ausüben (Matsumoto et al., 1998; Zhang et al., 1997; Mars et al., 2002), muss deren Beeinträchtigung in der β_2 m knockout Maus bei der Beurteilung des Krankheitsverlaufs der EAE mitbedacht werden.

4.3. Axonaler Schaden

β_2 m knockout Mäuse sind neben dem Fehlen von CD8 positiven T-Zellen und defekter NK-Zell-Funktion auch durch eine MHC I Defizienz gekennzeichnet. Sowohl die mit MOG₃₅₋₅₅ als auch die mit rMBP immunsiierten MHC I defizienten β_2 m knockout Mäuse zeigten, verbunden mit dem schwereren Krankheitsverlauf am Krankheitsmaximum, signifikant mehr APP positive Axone in immunhistochemischen Färbungen von Rückenmarksquerschnitten. Somit findet sich trotz fehlendem MHC I Molekül ein deutlicher Nachweis von geschädigten Axonen. In mehreren Studien wurde die CD8 T-Zell vermittelte Zytotoxizität und die MHC I Expression auf Neuronen eng mit direkter axonaler Schädigung in Zusammenhang gebracht (Übersicht Neumann 2002). Da bei β_2 m knockout Mäusen keine MHC I Expression vorliegt und die CD8 T-Zellfunktion defekt ist, sind diese Mechanismen demzufolge für axonale Schädigung bei chronisch-entzündlichen ZNS-Erkrankungen nicht unbedingt notwendig. Im Gegenteil führte das Fehlen dieser Mechanismen in unserem Mausmodell zu einer Erhöhung des axonalen Schadens. Zudem fand sich nach Induktion einer EAE in den MHC I defizienten Mäusen vermehrte Makrophagen und Mikrogliafiltration, eine qualitativ unterschiedliche T-Zellinfiltration und im Falle der MOG₃₅₋₅₅ - EAE auch mehr Demyelinisierung. Dies deckt sich mit Beobachtungen in MS Läsionen. Hier korrelierte das Ausmaß an axonaler Schädigung mit der Menge an Infiltration und Demyelinisierung (Trapp et al. 1998; Kornek et al., 2000; Kuhlmann et al., 2002). Somit stimmen unsere

Ergebnisse mit den Beobachtungen überein, dass axonale Schädigung bei massiver Makrophageninfiltration und/oder Demyelinisierung, auch unabhängig von MHC I Expression und CD8 T-Zellzytotoxizität ablaufen kann.

Mechanismen, die dann zu Schädigungen von Axonen führen können, sind z.B. Fas/FasL Interaktionen, TNF-alpha Zytotoxizität, freie Radikale, mangelnde Versorgung durch die in Mitleidenschaft gezogene Myelinscheide und auch Schädigung durch Perforin (Übersicht Bjartmar, Trapp, 2001; Redwine et al., 2001; Coleman, 2002). Andere Möglichkeiten, wie z. B. Schädigung durch von Makrophagen exprimierte Matrix Metalloproteinasen (Anthony et al., 2000; Newman et al., 2001) und weitere, sind oben bereits beschrieben (Pitt et al., 2000; Kornek et al., 2001; Redford et al., 1997; Schaecher et al., 2001).

Ergebnisse jüngerer Untersuchungen berichteten über eine Korrelation zwischen Ausmaß des axonalen Schadens und neurologischer Beeinträchtigung bei MS Patienten und im Tiermodell (Davie et al., 1995; DeStefano et al., 2001; Wujek et al., 2002). Auch anhand unseres EAE-Modells ließ sich diese Beobachtung bestätigen. Die β_2m knockout Mäuse wiesen in beiden EAE-Modellen stärkere Krankheitssymptome und vermehrten axonalem Schaden auf. Darüberhinaus zeigten die mit rMBP immunisierten Tiergruppen nicht nur eine allgemein milder verlaufende Erkrankung, sondern auch dazu passend allgemein weniger ausgeprägte axonale Schädigung, als die mit MOG immunisierten Tiere.

Die vermehrte Demyelinisierung bei den mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten β_2m knockout Mäusen kann zum Beispiel auf die erhöhte Makrophagen- und Mikrogliafiltration zurückzuführen sein. Die Aktivierung dieser Zellen scheint auch in MS Läsionen maßgeblich zur Demyelinisierung beitragen zu können (Werner et al., 2002).

Nach Immunisierung mit rMBP zeigte sich, wie auch schon in anderen Tiermodellen (Gold et al., 2000), kaum Demyelinisierung in beiden Tiergruppen. Dennoch ist auch hier bei den β_2m knockout Mäusen ein signifikant erhöhter axonaler Schaden zu verzeichnen. Somit scheint dieser, wie bereits in Studien

an MS Plaques oder im Ratten EAE-Modell beschrieben, zumindest teilweise auch unabhängig von primärer Demyelinisierung abzulaufen (Bitsch et al., 2000; Kornek et al., 2002).

4.4. Induktion einer EAE in C57BL/6 Mäusen mit rMBP

C57BL/6 (H-2b) und C57BL/10 (H-2b) Mäuse galten als resistent gegen die Induktion einer EAE durch Immunisierung mit MBP (Bernard, 1976; Raine et al., 1980; Fritz et al., 1985). Man ging davon aus, dass sich die Krankheit nur in Tieren die über einen ‚suszeptiblen‘ MHC Haplotyp verfügen, entwickelt. Wir konnten mit Hilfe eines neuen Boostprotokolls mit rMBP eine EAE in C57BL/6 Mäusen hervorrufen. Die zweimalige Verabreichung von 200 µg rMBP in CFA und anschließender Gabe von PTX, führte zu einer deutlichen, durch klinische und histologische Methoden nachweisbaren Erkrankung (Linker et al., 2005). Wie auch schon im EAE-Modell der Ratte (Gold et al., 2000) zeigten die Mäuse nach Immunisierung mit rMBP einen monophasischen Krankheitsverlauf und histologisch eine starke Entzündungsreaktion mit nur geringfügiger Demyelinisierung.

Weitere Immunisierungsprotokolle die erfolgreich zur Auslösung einer EAE geführt haben sind z. B. zusätzliche Injektion von IFN- γ oder Verabreichung von hohen Dosen des Antigens (Faunce et al., 2004). Auch die Kombination von aktiver Immunisierung mit Meerschweinchen MBP und Transfer MBP geprimter und in vitro stimulierter Lymphknotenzellen, verursachte eine schwere Erkrankung in C57BL/6 Mäusen (Shaw et al., 1992).

In anderen, ebenfalls als resistent betrachteten Mausstämmen gelang es Shaw und Mitarbeiter auch eine EAE zu induzieren. MHC- und T-Zellrezeptor-Gene sind demnach zwar essentiell für die Antigenerkennung bei der durch T-Zellen vermittelten EAE, allerdings bedingen sie wohl keine Resistenz gegen die Induktion einer solchen Erkrankung (Shaw et al., 1992).

5. Zusammenfassung

CD4 T-Zellen wurden lange Zeit als die vorwiegend pathogenen Immunzellen bei chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen wie der MS angesehen. Jüngere Studienergebnisse legen jedoch den Schluß nahe, dass ebenso CD8 T-Zellen maßgeblich an Krankheitsentstehung sowie Krankheitsverlauf beteiligt sind. In mehreren Studien, die sich der EAE als Tiermodell der MS bedienen, fanden sich sowohl Hinweise auf regulierende als auch pathogene Funktionen der CD8 T-Zellen. Wir untersuchten die Rolle der CD8 T-Zellen und der MHC I Expression anhand eines β_2 Mikroglobulin knockout Tiermodells. Aufgrund des fehlenden β_2 Mikroglobulins weisen die knockout Tiere eine defekte CD8 T-Zellfunktionalität und fehlende MHC I Expression auf. Eine EAE wurde mittels drei verschiedener enzephalitogener Antigene, dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG₃₅₋₅₅), dem basischen Myelinprotein aus der Ratte (rMBP) oder dem rekombinanten humanen basischen Myelinprotein (rhMBP) induziert. Folgende Ergebnisse konnten dabei beobachtet werden:

1. Im Vergleich zu den Wildtyptieren (C57BL/6) zeigten die β_2m knockout Mäuse sowohl bei der MOG₃₅₋₅₅ -EAE als auch bei der rMBP-EAE eine signifikant stärker ausgeprägte Erkrankung, verbunden mit erhöhter Inzidenz und Mortalität.
2. Histopathologisch fand sich eine vermehrte Infiltration von Makrophagen und Mikroglia bei β_2m Mäusen sowohl bei der MOG₃₅₋₅₅ als auch der rMBP-EAE, zusätzlich wurde bei der MOG₃₅₋₅₅ -EAE eine vermehrte CD4 T-Zellinfiltration und IFN-gamma Produktion bei den β_2m Mäusen nachgewiesen.
3. Die Demyelinisierung war bei β_2m Tieren im MOG₃₅₋₅₅ Modell deutlich stärker ausgeprägt als bei den Wildtyptieren; im MBP Modell zeigte sich in beiden Tierstämmen kaum Demyelinisierung.
4. Axonale Schädigung war bei den β_2m Tieren erhöht, sowohl im MOG₃₅₋₅₅ als auch im MBP Modell.

Zusammenfassend verursachte demnach das Fehlen von funktionellen CD8 T-Zellen und MHC I Expression in unserem Tiermodell eine Verstärkung der autoimmunen Gewebsschädigung im ZNS. Es fand sich eine vermehrte Infiltration von Makrophagen, Mikroglia und auch CD4 T-Zellen. Die IFN- gamma Produktion in β_2m Tieren war bei der MOG₃₅₋₅₅-EAE nachweislich erhöht. Der axonale Schaden war sowohl bei der MOG₃₅₋₅₅ als auch bei der MBP-EAE bei den knockout Tieren höher als bei den Kontrolltieren. Axonaler Schaden kann demzufolge auch ohne MHC I Expression und ohne zytotoxische CD8 T-Zellen ablaufen. In unserem Tiermodell war das Ausmaß der axonalen Schädigung in den knockout Tieren sogar höher als in den Kontrolltieren. Auch Demyelinisierung ist keine obligate Bedingung für axonalen Schaden, im MBP Modell war deutlicher axonaler Schaden trotz kaum vorhandener Demyelinisierung nachweisbar.

6. Literaturverzeichnis

Adelmann M, Wood J, Benzel I, Fiori P, Lassmann H, Matthieu JM, Gardinier MV, Dornmair K, Linington C, 1995; The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat; *J Neuroimmunol*;63(1):17-27

Anthony DC, Hughes P, Perry VH, 2000; The evidence for primary axonal loss in multiple sclerosis; *Rev Neurol* 16-30(12):1203-8

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K 2000; Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction; *J Exp Med* 192(3):393-404

Banik NL, Matzelle DC, Gantt-Wilford G, Osborne A, Hogan EL, 1997; Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury; *Brain Res* 28;752(1-2):301-6

Barnes d, Munro PM, Youl BD, Prineas JW, McDonald WI, 1991; The longstanding MS lesion. A quantitative MRI and electron microscopic study; *Brain*;114(Pt 3):1271-80

Begolka WS, Haynes LM, Olson JK, Padilla J, Neville KL, DalCanto M, Palma J, Kim BS, Miller SD, 2001; CD8-deficient SJL mice display enhanced susceptibility to Theiler's virus infection and increased demyelinating pathology; *J Neurovirol*;7(5):409-20

Bernard CC, 1976; Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: genetic control of susceptibility; *J Immunogenet*;3(4):263-74

Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski s, Kuhlmann T, Bruck W, 2000; Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation; *Brain*;123 (Pt 6):1174-83

Bjartmar C, Trapp BD, 2003; Axonal degeneration and progressive neurologic disability in multiple sclerosis, *Neurotox Res* 5(1-2):157-64

Bjartmar C, Trapp BD, 2001; Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences, *Curr Opin Neurol*;14(3):271-8

Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD, 2003; Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease, *J Neurol Sci* 15;206(2):165-71

Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA, Lassmann H, 1995; Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions; *Ann Neurol*;38(5):788-96

Brück W, Sommermeier N, Bergmann M, Zettl U, Goebel HH, Kretzschmar HA, Lassmann H, 1996; Macrophages in multiple sclerosis; *Immunobiology*; 195(4-5):588-600

Charcot JM ; Lecons sur les maladies du système nerveux faites à la Salpêtrière. Tome 1 4è ed. Paris,1880

Charcot JM; Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hop civils et militaires* 1868; 140:554-555 and 141:557-558 and 143:556

Chen Y, Inobe J, Weiner HL, 1995; Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression; *J Immunol* 15;155(2):910-6

Coleman MP; Perry VH, 2002; Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target; *Trends Neurosci*; 25(10):532-7

Cook JR, Solheim JC, Connolly JM, Hansen TH, 1995; Induction of peptide-specific CD8+ CTL clones in beta 2-microglobulin-deficient mice; *J Immunol* 1;154(1):47-57

Davie CA, Barker GJ, Webb S, Tofts PS, Thompson AJ, Harding AE, McDonald WI, Miller DH 1995; Persistent functional deficit in multiple sclerosis and autosomal dominant cerebellar ataxia is associated with axon loss; *Brain*; 118:1583-92

De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnaoutelis R, Tartaglial MC, Antel JP, Matthews PM, Arnold DL 2001; Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability; Arch Neurol; 58(1):65-70

Eugster HP, Frei K, Bachmann R, Bluethmann H, Lassmann H, Fontana A, 1999; Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1; Eur J Immunol; 29(2):626-32

Faunce DE, Terajewicz A, Stein-Streilein J 2004; Cutting edge: in vitro-generated tolerogenic APC induce CD8+ T regulatory cells that can suppress ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis; J Immunol 15;172(4):1991-5

Filippi M, Bozzali M, Rovaris M, Gonen O, Kesavadas C, Ghezzi A, Martinelli V, Grossman RI, Scotti G, Comi G, Falini A 2003; Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis; Brain; 126(Pt 2);433-7

Fritz RB, Skeen MJ, Chou CH, Garcia M, Egorov IK, 1985; Major histocompatibility complex-linked control of the murine immune response to myelin basic protein; J Immunol; 134(4):2328-32

Fritz RB, Zhao ML, 2001; Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the C57BL/6J mouse by NK1.1+, DX5+, alpha beta+ T cells, J Immunol 15; 166(6):4209-15

Fritz RB, Chou CH, McFarlin DE 1983; Relapsing murine experimental allergic encephalomyelitis induced by myelin basic protein; J Immunology 130(3):1024-6

Fromann C; Untersuchungen über die Gewebsveränderungen bei der multipilen Sklerose des Gehirns und Rückenmarks; Jena 1878

Gimsa U, Peter SV, Lehmann K, Bechmann I, Nitsch R, 2000; Axonal damage induced by invading T cells in organotypic central nervous system tissue in vitro: involvement of microglial cells; Brain Pathology; 10(3):365-77

Gold R, Hartung HP, Toyka KV 2000; Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system; Mol Med Today 6(2):88-91.

Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel CJ, Ohlen C, Goverman J, 2001; A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis; *J Exp Med* 194 (5):27-30

Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, Schock S, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B 2002; Oligoclonal expansion of memory CD 8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients; *Brain* 125:538-50

Jiang H, Braunstein NS, Yu B, Winchester R, Chess L, 2001; CD8+T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+ T cells in EAE mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 22;98(11):6301-6

Jiang H, Zhang SI, Pernis B 1992; Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis; *Science* 22;256(5060):1213-5

Jurewicz A, Biddison WE, Antel JP 1998; MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes; *J Immunol* 160(6):3056-9

Koh DR, Fung-Leung WP, Ho A, Gray D, Acha-Orbea H, Mak TW 1992; Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD 8-/- mice; *Science* 256(5060):1210-3

Kojima K, Berger T, Lassmann H, Hinze-Selch D, Zhang Y, Gehrman J, Reske K, Wekerle H, Linington C 1994; Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia; *J Exp Med.* 180(3):817-29

Koller BH, Marrack P, Kappler JW, Smithies O, 1990; Normal development of mice deficient in beta 2m, MHC class I Proteins, and CD8+ T-cells; *Science* 8;248(4960):1227-30

Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H, 2000; Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions; *Am J Pathol*;157(1):267-76

Kornek B, Storch MK, Bauer J, Djamshidian A, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Zimprich F, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H, 2001; Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis; *Brain*; 124:1114-24

Kornek B, Lassmann H, 1999; Axonal Pathology in Multiple Sclerosis. A Historical Note, *Brain Pathol*; 9:651-656

Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W, 2002; Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time, *Brain*; 126(Pt 10):2202-12

Linker RA, Gold R, 2005 MBP-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 Mice, *J Immunol* 15;172(4):1991-5

Linker RA, Maurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R 2002; CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation; *Nature Med* 8(6):620-4

Mars LT, Laloux V, Goude K, Desbois S, Saoudi A, Van Kaer L, Lassmann, Herbelin A, Lehuen A, Liblau RS, 2002; Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice; *J Immunol* 15 ;168(12) :6007-11

Martin R. McFarland HF, MacFarlin DE 1992; Immunological aspects of demyelinating diseases; *Annu Rev Immunol.* 10:153-87

Matsumoto Y, Kohyama K, Aikawa Y, Shin T, Kawazoe Y, Suzuki Y, Tanuma N, 1998; Role of natural killer cells and TCR gamma delta T cells in acute autoimmune encephalomyelitis; *Eur J Immunol*; 28(5):1681-8

Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. 2001; Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes; *Am J Pathol*; 159(3):809-15

Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A 1995; A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental automimmune

encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells; *Eur J Immunology* 25(7):1951-9

Neumann H, Schmidt H, Vavalié A, Jenne D, Wekerle H. 1997; Major histocompatibility complex class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha; *J Exp Med* 20;185(2): 305-16

Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. 2002; Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases; *Trends Neurosci*;25(6):313-9

Neumann H, 2003; Molecular mechanisms of axonal damage in inflammatory central nervous system diseases; *Curr Opin Neurol*; 16(3):267-73

Newman TA, Woolley ST, Hughes PM, Sibson NR, Anthony DC, Perry VH, 2001; T-cell- and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases; *Brain*; 124:2203-14

Onuki M, Ayers MM, Bernard CC, Orian JM, 2001; Axonal degeneration is an early pathological feature in autoimmune-mediated demyelination in mice, *Microsc Res Tech* 15;52(6):731-9

Oshiro Y, Eylar EH, 1970; Allergic encephalomyelitis: preparation of the encephalitogenic basic protein from bovine brain; *Arch Biochem Biophys*; 138(2):392-6

Panitch HS, McFarlin DE 1997; Experimental allergic encephalomyelitis: enhancement of cell-mediated transfer by concanavalin A; *J Immunol*. 119(3):1134-7

Pette M, Fujita K, Kitze B, Whitaker JN, Albert E, Kappos L, Wekerle H 1990; Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals; *Neurology* 40(11):1770-6

Pitt D, Werner P, Raine CS, 2000; Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis; *Nat Med*; 6(1):67-70

Raine CS, Barnett LB, Brown A, Behar T, McFarlin DE, 1980; Neuropathology of experimental allergic encephalomyelitis in inbred strains of mice, *Lab Invest* 43(2):150-7

Raulet DH, 1994; MHC class I deficient mice; *Adv Immunol*; 55:381-421

Redford EJ, Kapoor R, Smith KJ, 1997; Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible; *Brain* 120:2149-57

Redwine JM, Buchmeier MJ, Evans CF, 2001; In vivo expression of major histocompatibility complex molecules on oligodendrocytes and neurons during viral infection; *Am J Pathol*; 159(4):1219-24

Rivera-Quinones C, McGavern D, Schmelzer JD, Hunter SF, Low PA, Rodriguez M, 1998; Absence of neurological deficit following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis; *Nature Med* 4(2):187-93

Schaecher KE, Shields DC, Banik NL, 2001; Mechanism of myelin breakdown in experimental demyelination: a putative role for calpain; *Neurochem Res* 26(6):731-7

Shaw MK, Kim C, Ho KL, Lisak RP, Tse HY, 1992; A combination of adoptive transfer and antigenic challenge induces consistent murine experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice and other reputed resistant strains, *J Neuroimmunol* 39(1-2):139-49

Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, Wekerle H, Hohlfeld R, Goebels N 2004; Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood, *Proc Natl Acad Sci USA* 24 101(8):2428-33

Slavin A, Ewing C, Liu J, Ichikawa M, Slacin J, Bernard CC 1998; Induction of a multiple sclerosis-like disease in mice with a immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein; *Autoimmunity* 28(2):109-20

Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H 1998; Autoimmunity to myelin

oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology; *Brain Pathol* 8(4):681-94

Sun D, Whitaker JN, Hunag Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, Raine CS 2001; Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice; *J Immunol* 15 166(12):7579-87

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork s, Bo L, 1998; Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis; *N Engl J Med* 29 338(5):278-85

Trapp BD, Tansohoff R, Rudick R, 1999; Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability; *Curr Opin Neurol* 12(3):295-302

Tsuchida T, Parker KC, Turner RV, McFarland HF, Coligan JE, Biddison WE 1994; Autoreactive CD8+ T-cell responses to human myelin protein-derived peptides; *Proc Natl Acad Sci USA* 91(23):10859-63

Ure DR, Rodriguez M, 2002; Preservation of neurologic function during inflammatory demyelination correlates with axon sparing in a mouse model of multiple sclerosis; *Neuroscience* 111(2):399-411

van Walderveen MA, Barkhof F, Hommes OR, Polman CH, Tobi H, Frequin ST, Valk J, 1995; Correlating MRI and clinical disease activity in multiple sclerosis: relevance of hypointense lesions on short-TR/short-TE (T1 – weighted) spin-echo images; *Neurology* 45(9):1684-90

van Walderveen MA, Kamphorst W, Scheltens P, van Waesberghe JH, Ravid R, Valk J, Polman CH, Barkhof F 1998; Histopathologic correlate of hypointense lesions on T1-weighted spin-echo MRI in multiple sclerosis. *Neurology* 50(5):1282-8

Werner K, Bitsch A, Bunkowski S, Hemmerlein B, Bruck W, 2002; The relative number of macrophages/microglia expressing macrophage colony-stimulating factor and its receptor decreases in multiple sclerosis lesions; *Glia* 40(1):121-9

Wujek JR, Bjartmar C, Richer E, Ransohoff RM, Yu M, Tuohy CK, Trapp BD, 2002; Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis; *J Neuropathol Exp Neurol* 61(1):23-32

Zamvil SS, Steinman L 1990; The T Lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis; *Annu Rev Immunol* 8:579-621

Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T, 1997; Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells; *J Exp Med* 17 186(10):1677-87

Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R, 1990; Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells; *Nature* 19 344(6268):742-6

7. Liste der Abkürzungen

APP	amyloid precursor protein
ConA	Concanavalin A
CFA	komplettes Freundesches Adjuvans
CD	Cluster of differentiation (Differenzierungscluster)
Ci	Curie
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
IL	Interleukin
IFN	Interferon
LFB	Luxol fast blue
MBP	basisches Myelinprotein
MHC I	major histocompatibility complex 1 (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
p.i.	post Immunisierung
PHA	Phytohämagglutinin
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphatpuffer)
PFA	Paraformaldehyd
PPD	Purified Protein Derivative
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
TBS	Tris buffered saline (Trispuffer)
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. R. Gold danke ich für die Überlassung des Themas sowie die beständige, ausgezeichnete Anleitung.

Herrn Dr. R. Linker danke ich für die in allen Beziehungen hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit.

Herrn Prof. Toyka danke ich für die guten Arbeitsbedingungen in einem wissenschaftsförderlichen Klima.

Frau Verena Wörtmann, Frau Helga Brünner, Frau Silvia Seubert und Frau Annette Horn sei Dank für die zuverlässige technische Unterstützung im Labor.

Evelyn Rott

Friedrichstr. 40 • 91054 Erlangen • Tel.: 09131 / 125715 • E-Mail: evelyn.rott@gmx.de

Persönliche Daten

Name: Evelyn Rott
Geburtsdaten: geb. 04.02.1976 in Illertissen
Familienstand: ledig

Schulbildung

1982 – 1986 Grundschole Buch
1986 – 1995 Kolleg der Schulbrüder Illertissen
1995 Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife (1,7)

Studium

11/1995 – 2/1996 Studium der Rechtswissenschaften, Universität Augsburg
seit 5/1997 Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg
3/1999 Ärztliche Vorprüfung (ausreichend)
3/2000 1. Staatsexamen (befriedigend)
9/2002 2. Staatsexamen (gut)
10/2002 Beginn des Praktischen Jahres
11/2003 3. Staatsexamen (gut)
10/2004 Approbation

Praktisches Jahr

Innere Medizin: Universitätsklinikum Würzburg (4 Monate)
Neurologie: Universitätsklinikum Würzburg (4 Monate)
Chirurgie: Royal Brisbane Hospital, Brisbane, Australien (2 Monate)
Universitätsklinikum Würzburg (2 Monate)

Berufliche Tätigkeit

seit 06/2004

Ärztin im Praktikum/Assistenzärztin,
Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum
Erlangen
Gastroenterologie (7 Monate)
Pneumologie (seit 6 Monaten)

Promotion

„Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis in beta-2 Mikroglobulin knockout Mäusen“

experimentelle Studie bei Doktorvater Prof. Dr. med. R. Gold, Multiple Sklerose Forschungsgruppe der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg

Famulaturen

Innere Medizin:

Stiftungsspital Weißenhorn (1999)

Chirurgie:

Gemeinschaftspraxis Dr. med. Wasmer, Dr.
med. Volk; Karlstadt (2001)

Neurologie:

Universitätsklinik Würzburg (2001)

Psychiatrie:

Universitätsklinik Würzburg (2002)

Praktische Erfahrungen

3/1996 – 3/1997

Pflegepraktikum am Stiftungsspital
Weißenhorn,
Internistische Abteilung

2/1999 – 5/2000

Nachtwachen: Dermatologie, Urologie
Universitätsklinikum Würzburg

Veröffentlichungen

Linker R.A., Rott E., Hofstetter H.H., Hanke T., Toyka K.V., Gold R; EAE in beta-2 microglobulin deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses; Neurobiol Dis 2005 19(1-2):218-28

Rott E, Linker R, Hofstetter H, Hanke T, Toyka K, Gold R,
EAE in beta-2 Mikroglobulin knock-out-Mäusen: axonaler Schaden entsteht unabhängig von MHC-I Expression, Studentensymposium der 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie in Hamburg, 2003; Vortrag S 16