

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Toyka

**In vivo-Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle
ICAM-1 und VCAM-1 bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis:
Untersuchungen mit target-spezifischen Ultraschallkontrastmitteln**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilian-Universität Würzburg
vorgelegt von
Sebastian Doerck
aus Würzburg

Würzburg, März 2007

Referent: PD Dr. Mathias Mäurer

Korreferent: Prof. Dr. Klaus Toyka

Mündlicher Prüfer: PD Dr. A. Weishaupt

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2007

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Multiple Sklerose und Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	1
1.2. Rolle der Blut-Hirn-Schranke bei der EAE	2
1.3. Identifizierung molekulare Marker	4
1.4. Molekulare Bildgebung	4
1.4.1. Grundlagen und Voraussetzungen molekularer Bildgebung	4
1.4.2. Ultraschallbasierte molekulare Bildgebung	5
1.4.2.1. Grundlagen	5
1.4.2.2. Target-spezifische Ultraschallkontrastmittel	6
1.4.2.3. Ultraschall-basierte Abbildung von Adhäsionsmolekülen bei der EAE	7
1.4.2.4. Quantifizierung von Adhäsionsmolekülen bei der EAE mit der SPAQ-Technologie	7
1.5. Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Material	12
2.1.1. Lymphozyten-Zelllinien	12
2.1.2. Chemikalien und Reagentien	12
2.1.3. Antikörper	15
2.1.4. Geräte	16
2.1.5. Verbrauchsmaterialien	16

2.2.	Methoden	18
2.2.1.	Versuchstiere	18
2.2.2.	MBP-spezifische adoptive-transfer experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (AT-EAE)	18
2.2.2.1.	Restimulation enzephalithogener T-Lymphozyten und Induktion der MBP-AT-EAE	18
2.2.2.2.	EAE: Erfassung von Krankheitsaktivität und –verlauf	20
2.2.3.	Gewebegewinnung und –aufbereitung	22
2.2.4.	Immunhistochemie	23
2.2.4.1.	Immunhistochemische Färbung von ICAM-1 und VCAM-1	23
2.2.4.2.	Charakterisierung und Quantifizierung der entzündlichen Aktivität	24
2.2.5.	Ultraschall-basierte Messung der Adhäsionsmolekül- Expression	25
2.2.5.1.	Versuchsaufbau	26
2.2.5.2.	Durchführung der in vivo Ultraschall-Messungen	27
2.2.5.3.	Auswertung	28
2.2.6.	Durchflusszytometrie des ZNS zur Charakterisierung und Quantifizierung zellulärer Subpopulationen	29
2.2.6.1.	Gewinnung und Aufbereitung von Splenozyten und ZNS- Lymphozyten	29
2.2.6.2.	Färbung der Zellen	30
2.2.6.3.	Durchführung und Auswertung der Durchflusszytometrie	32
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Einfluss von targetspezifischen USKM auf den Verlauf der AT-EAE	33
3.2.	Sequentielle Ultraschall-Untersuchung der ICAM-1 und VCAM-1- Expression bei der MBP-AT-EAE	34
3.3.	Histologische Untersuchung der Expressionskinetik von ICAM-1 und VCAM-1 im Gehirn und Rückenmark der AT-EAE	40
3.4.	Histopathologische Quantifizierung der entzündlichen Aktivität	48
3.5.	FACS-Analyse der Subpopulationen des zellulären Infiltrates im ZNS	50
3.6.	Blockade von ICAM-1 in vivo bei AT-EAE mit monoklonalen	53

Antikörpern

4.	Diskussion	58
4.1.	Diskussion zur Funktion der BHS	58
4.2.	Molekulare Bildgebung, ihre Möglichkeiten und Perspektiven	62
5.	Zusammenfassung	69
6.	Literaturverzeichnis	71

Abkürzungsverzeichnis

AC	Acoustical Counts
AK	Antikörper
AT-EAE	Adoptive Transfer experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
APC	Antigen Präsentierende Zelle
APhC	Allophycocyanin (Fluoreszenzfarbstoff)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
EDSS	Expanded Disability Status Scale
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)
FITC	Fluorescein Iso-Thiocyanate (Fluoreszenzfarbstoff)
FoxP3	Forkhead Box Protein 3
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhesionsmolekül Intercellular Adhesion Molecule 1
MBP	Basisches Myelinprotein Myelin basic protein
gpMBP	MBP vom Meerschweinchen (guinea pig)
MP	Mikropartikel, USKM
MRT	Magnetresonanz-/ Kernspintomographie
MS	Multiple Sklerose
p.a.T.	post adoptivem Transfer
PBCA	Poly(butyl-2-cyanoacrylat))
PerCP	Peridinin Chlorophyll a Protein Fluoreszenzfarbstoff)
PET	Positronenemissionstomographie
ROI	Region of interest
R-PE	R-Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)

SAE	Stimulated Acoustic Emission
SPAQ	Sensitive Particle Acoustic Quantification
SPECT	Single-Photon Emissions(Computer)Tomographie
Treg	Regulatorische T-Zelle
US	Ultraschall
USKM	Ultraschallkontrastmittel
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhesionsmolekül 1 Vascular Adhesion Molecule 1
ZNS	Zentrales Nervensystem
1A-29	Monoklonaler Antikörper gegen ICAM-1

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose und Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) in unseren Breiten. Weltweit rechnet man mit über 2 Millionen Erkrankten, in Deutschland geht man derzeit von ca. 120000 MS Patienten aus. Die Erkrankung manifestiert sich in der Regel im jungen Erwachsenenalter mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter zwischen 20 und 40 Jahren. Die MS ist gekennzeichnet durch das schubförmige Auftreten neurologischer Defizite in unterschiedlichen Funktionssystemen des zentralen Nervensystem. Die Ursache der Erkrankung ist bisher nicht bekannt, wahrscheinlich liegt ein multifaktorielles Geschehen zugrunde. Demnach kommt es beim Zusammentreffen einer genetischen Prädisposition mit bestimmten exogenen Faktoren zur Auslösung einer T-Zell vermittelten Autoimmunreaktion gegen die Myelinscheiden der Neurone des ZNS, die zu Demyelinisierung und axonaler Schädigung führt. Daneben gibt es eine Vielzahl von Daten, die für die Beteiligung B-Zell- bzw. Antikörper-vermittelter Effekte (Raine et al., 1999; Storch et al., 1998) sowie degenerativer Prozesse (Lucchinetti et al., 2000) an der Pathogenese der MS sprechen. Das korrespondierende Tiermodell der MS, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankung, mit der wesentliche Erkenntnisse zur Pathogenese der MS gewonnen wurden. Demnach kommt es bei der EAE und MS zu einer Aktivierung autoreaktiver Myelin-spezifischer Entzündungszellen, die nach Wechselwirkung mit den Adhäsionsmolekülen des zerebralen Endothels die Blut-Hirn-Schranke durchwandern und im Hirnparenchym auf ihr Zielantigen treffen. Dadurch wird eine lokale Entzündung hervorgerufen. Durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine erfolgt eine weitere Rekrutierung von Entzündungszellen und Verstärkung der Entzündungsreaktion. Die Demyelinisierung von Axonen kann sowohl direkt durch zytotoxische Effekte der Makrophagen als auch durch die Antikörper-abhängige, Makrophagen-vermittelte Zytotoxizität erfolgen. Auch können zytotoxische Entzündungsmediatoren zu einer Schädigung des Myelins führen. Bei der sogenannten

adoptiven Transfer (AT) EAE führt die unmittelbare Injektion autoreaktiver MBP-spezifischer T-Zellen nach 3 - 5 Tagen zu einer Autoimmunentzündung im zentralen Nervensystem, die sich in einer Schwanzlähmung, Lähmung der Hinterläufe und einem Gewichtsverlust äußert. Die AT-EAE ist besonders geeignet, die pathogenetischen Vorgänge der Effektorphase der Erkrankung, also insbesondere die Einwanderung von Entzündungszellen über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu untersuchen.

1.2. Rolle der Blut-Hirn-Schranke bei der EAE

Bei chronischen autoimmunvermittelten Erkrankungen wie der MS und EAE ist die Migration von Entzündungszellen über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS von entscheidender pathogenetischer Bedeutung (Gold et al., 2000; Noseworthy et al., 2000). Die Migration in das ZNS wird durch eine komplexe molekulare Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Entzündungszellen reguliert. (Archelos und Hartung, 1997; Engelhardt et al., 1994). Vereinfacht kann diese Kaskade am Stufenmodell der Zelladhäsion und Transmigration über die Blut-Hirn- bzw. Blut-Rückenmark-Schranke erläutert werden.

In einem ersten Schritt, dem sog. „rolling“ werden die Entzündungszellen zunächst durch die Interaktion von Selektinen auf Lymphozyten (L-Selektin) und Endothelzellen (E- und P-Selektinen) im Blutstrom abgebremst. Allerdings ist dieser Vorgang des Selektin-vermittelten „rollings“ nicht an allen Endothelbarrieren von Bedeutung. Im ZNS spielen Selektine wahrscheinlich keine Rolle (Engelhardt et al., 1997). Hier werden Entzündungszellen direkt durch die Interaktion des endothelialen Adhäsionsmoleküls vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 mit seinem leukozytären Liganden, dem Integrin VLA-4, aus dem Blutstrom abgefangen (Engelhardt et al., 1998, Laschinger et al., 2000). Gleichzeitig werden die Lymphozyten von Chemokinen an der Endotheloberfläche aktiviert. Eine weitere wichtige Verbindung folgt dann durch Interaktion eines weiteren endothelialen Adhäsionsmoleküls, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, mit seinem Liganden LFA-1 auf der Oberfläche aktivierter Leukozyten (Laschinger et al., 2002). Diese

Interaktion der Adhäsionsmoleküle ist für aktivierte Entzündungszellen die entscheidende Voraussetzung, um die Endothelbarriere zu überwinden und entlang eines Chemokingradienten ins Zielgewebe einzuwandern (Leong-Poi et al., 2003; Lindner et al., 2000, 2004).

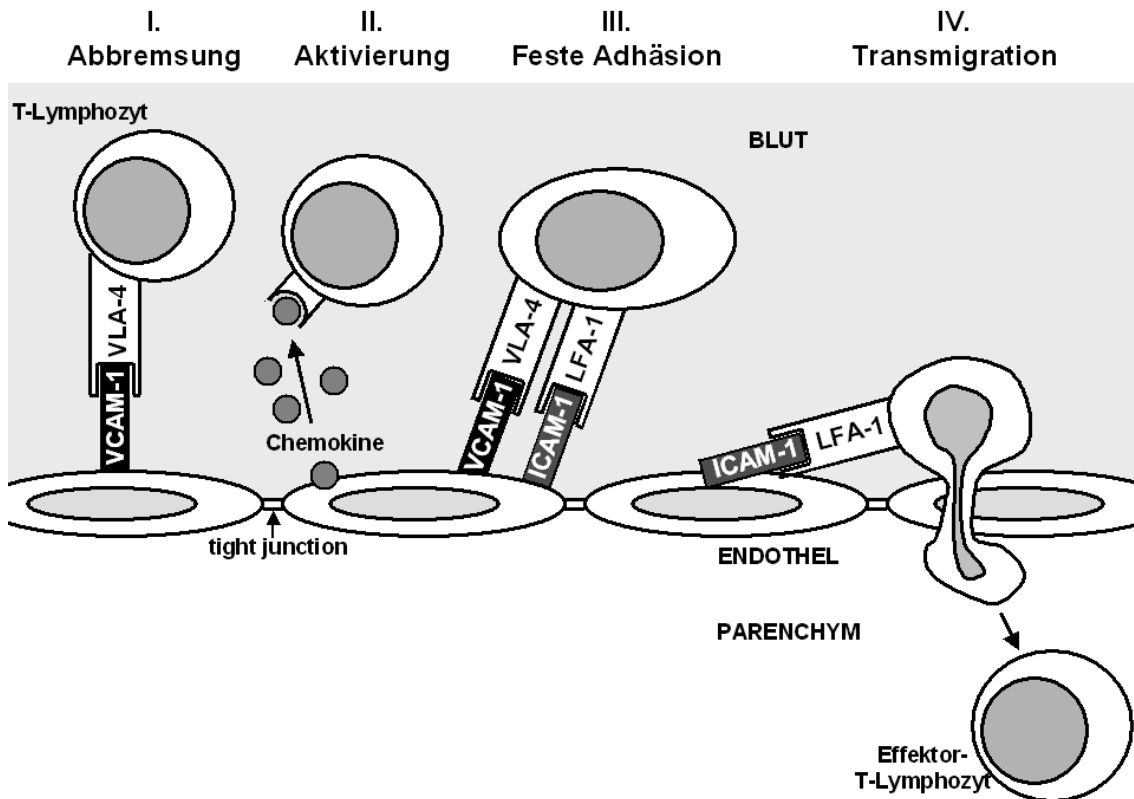


Abb. 1:
Stufenmodell der Transmigration von Entzündungszellen über die Blut-ZNS-Schranke (vereinfacht nach Engelhardt und Ransohoff, 2005)

I) Am Endothel postkapillärer Venolen erfolgt als erster Schritt eine direkte Abbremsung aktivierter Lymphozyten aus dem Blutstrom durch die Interaktion von VCAM-1 auf Endothelzellen mit dem alpha4-Integrin VLA-4 auf Lymphozyten. Das selektinvermittelte sog. „Rolling“ ist hier eher von untergeordneter Bedeutung.

II) Durch Chemokine des Endothels kommt es zu einer G-Protein-vermittelten Aktivierung der lymphozytären Integrine (VLA-4, LFA-1) und dadurch zu einer erhöhten Affinität zwischen Integrinen und endothelständigen Adhäsionsmolekülen.

III) Die Affinitätssteigerung zwischen lymphozytären und endothelialen Bindungspartnern ermöglicht in einem dritten Schritt die feste Adhäsion der Entzündungszelle am Endothel. VLA-4 und LFA-1 auf aktivierten Lymphozyten binden dabei an VCAM-1 und ICAM-1.

IV) Diese Leukozyten-Endothel-Interaktionen sind die entscheidenden Voraussetzungen für die transendotheliale Migration der Lymphozyten entlang eines Chemokingradienten in das entzündete ZNS-Gewebe.

1.3. Identifizierung molekularer Marker

Eine verlässliche Methode zur Identifizierung molekularer Marker ist die immunhistochemische Untersuchung von Geweben mittels spezifischer markierter Liganden. Hierbei wird das Gewebe nach Entnahme histologisch aufgearbeitet und immunhistologisch gezielt auf die Expression eines oder mehrerer molekularer Marker untersucht. Die Identifikation eines Markers erfolgt in der Regel qualitativ und semi-quantitativ. Außerdem kann die Histologie auch nur das Expressionsmuster molekularer Marker genau zu dem Zeitpunkt der Gewebeentnahme wiedergeben. Aktuell werden zur Identifizierung molekularer Zielstrukturen biologische Schlüsseltechnologien, wie Genomics/Bioinformatics und Proteomics verwendet. Bei diesen Technologien werden die Sequenzen beispielsweise der menschlichen Gene mit speziellen Bioinformatik-Tools analysiert, um pharmakologisch interessanten Proteinfamilien angehörende Proteine, insbesondere Rezeptoren und Enzyme, zu identifizieren und näher zu beschreiben. Hierbei handelt es sich um *in vitro*-Verfahren, die beispielsweise an frisch isolierten (primären) Zellen und Zellkulturen (aus erkranktem oder gesundem Gewebe) eingesetzt werden. Zur Detektion molekularer Marker werden auch unter dem Begriff „molekulare Bildgebung“ viele diagnostische Verfahren *in vivo* getestet.

1.4. Molekulare Bildgebung

1.4.1. Grundlagen und Voraussetzungen molekularer Bildgebung

Unter molekularer Bildgebung versteht man eine relativ neue Technologien, die eine nichtinvasive Darstellung und Quantifizierung dynamischer biologischer und biochemischer Vorgänge *in vivo* ermöglicht. Die Zielstrukturen dieser Verfahren befinden sich dabei auf molekularer Ebene.

Grundlegende Voraussetzungen für molekulare Bildgebung sind zum einen das Vorhandensein geeigneter Sonden, welche in der Lage sind, die interessierenden molekularen Strukturen spezifisch zu erkennen und zu markieren und zum anderen die

Detektierbarkeit dieser Sonden mittels bildgebender Verfahren. Des weiteren sollten eine hohe Spezifität für das Zielmolekül, eine hohe Sensitivität, eine ausreichend hohe räumliche Auslösung sowie die Quantifizierbarkeit der Signale gewährleistet sein. Derzeit wird die molekulare Bildgebung zur Darstellung physiologischer Vorgänge und pathologischer Veränderungen in unterschiedlichen experimentellen Systemen verwendet. Das langfristige Ziel ist die Anwendbarkeit auch am Menschen. In der klinischen Diagnostik bereits gut etablierte Verfahren sind radionuklidbasierte Techniken wie beispielsweise die Positronenemissions-Tomographie (PET) und die Single-photon Emissionstomography (SPECT), bei denen in den letzten Jahren bereits große Fortschritte erzielt wurden. Daneben gibt es optische Verfahren mit Sonden, die über die Emission von sichtbarem Licht, Fluoreszenz oder Infrarotstrahlung detektiert werden können.

1.4.2. Ultraschall-basierte molekulare Bildgebung

Neben den oben genannten Verfahren gewinnen seit einigen Jahren Ultraschall (US)-basierte Methoden vermehrt an Bedeutung. Die Vorteile dieser Methode liegen in der relativ einfachen Anwendbarkeit und der geringen Invasivität. Schon geringste Mengen eines Ultraschallkontrastmittels (USKM) können mit gängigen Ultraschallsystemen dargestellt werden. Wegen zahlreicher denkbarer Anwendungsmöglichkeiten dürften ultraschallkontrastmittel-basierte Methoden in Zukunft auch im klinischen Bereich auf großes Interesse stoßen.

1.4.2.1. Grundlagen

Die ultraschallbasierte molekulare Bildgebung arbeitet mit hochauflösenden Ultraschallsystemen, wie sie aus der klinischen Routinediagnostik bekannt sind. Ultraschallkontrastmittel finden seit einigen Jahren in der klinischen Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen Verwendung. Hierbei wird die Erhöhung der

Echogenität des Blutes im Sinne einer verstärkten Rückstreuung der Schallwellen durch das USKM genutzt.

Als USKM werden luft- oder gasgefüllte Mikrobläschen oder -partikel (MP) mit einem Durchmesser von 1-5µm eingesetzt, deren dünne Hülle aus Lipiden, Proteinen oder polymeren Molekülen besteht. Die Größe, das Hüllmaterial und dessen Dicke sowie das verwendete Gas bestimmen ihre physiko-akustischen Eigenschaften. Während niedrige Schalldrücke bzw. Schallamplituden zu einem Schwingen der MP, einer linearen Rückstreuung der Schallwellen und somit zu einer Verstärkung des Echosignals führen, werden MP durch höhere Schallamplituden zerstört und erzeugen dadurch ein starkes, nicht-lineares Signal, das vom Ultraschallgerät als schnelle Bewegung fehlinterpretiert wird und sich im Farbdopplermodus als ein charakteristisches Farbsignal auf dem Bildschirm darstellt. Dieses Phänomen wird „Stimulated Acoustic Emission“- Effekt (SAE-Effekt) oder „Loss of Correlation“ (Hauff et al., 1997; Uhendorf et al., 2000) genannt und ist die Grundlage für die molekulare Bildgebung mit Ultraschall. Bemerkenswert im Hinblick auf eine hohe Sensitivität ist dabei die Tatsache, dass aufgrund seiner Intensität das SAE-Signal einzelner MP in einigen Zentimetern Gewebetiefe noch ausreicht, um als charakteristisches MP-Signal in der Sonographie zur Darstellung zu kommen.

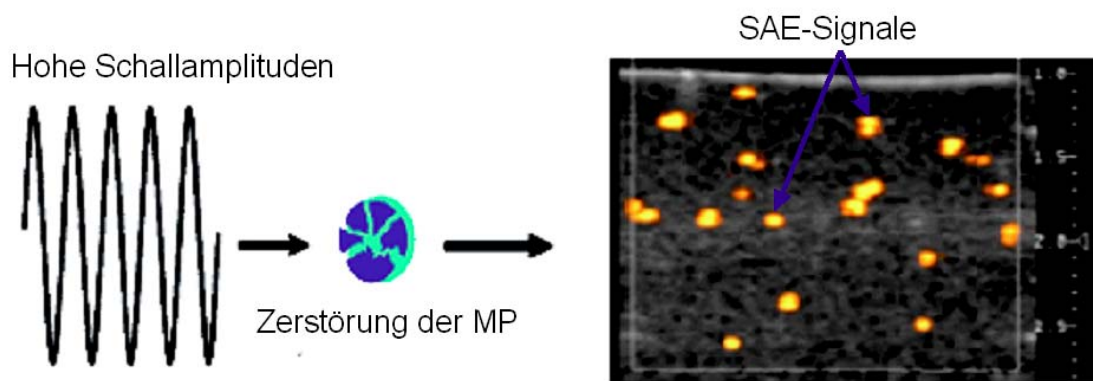


Abb. 2:

Generierung von SAE („stimulated acoustic emission“) -Signalen

Gas- oder luftgefüllte Mikropartikel werden durch das Auftreffen hochamplitudiger Ultraschallwellen zerstört und senden daraufhin ein charakteristisches, sog. SAE-Signal aus, welches vom Ultraschallgerät als Bewegung interpretiert wird und im Farbdopplermodus als farbiger Punkt dargestellt werden kann. Die hier abgebildeten SAE-Signale wurden in einem Agarphantom generiert. Jeder Farbpunkt stammt jeweils von einem einzelnen Mikropartikel.

1.4.2.2. Target-spezifische Ultraschallkontrastmittel

Target-spezifische USKM lassen sich durch Kopplung von Antikörpern oder Peptiden an die Mikropartikel herstellen. Bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden MP verwendet, an die Streptavidin gekoppelt ist, ein Glykoprotein, das eine hohe Affinität zu Biotin besitzt. Durch die gemeinsame Inkubation von Streptavidin-MP und biotinylierten Antikörpern lassen sich target-spezifische Ultraschallkontrastmittel herstellen, die sich gut für selektive Untersuchungen eines bestimmten Moleküls und dessen Verhalten in Hinblick auf Stärke, Zeitpunkt und Dauer der Expression im gesunden Individuum und im Laufe einer Erkrankung eignen.

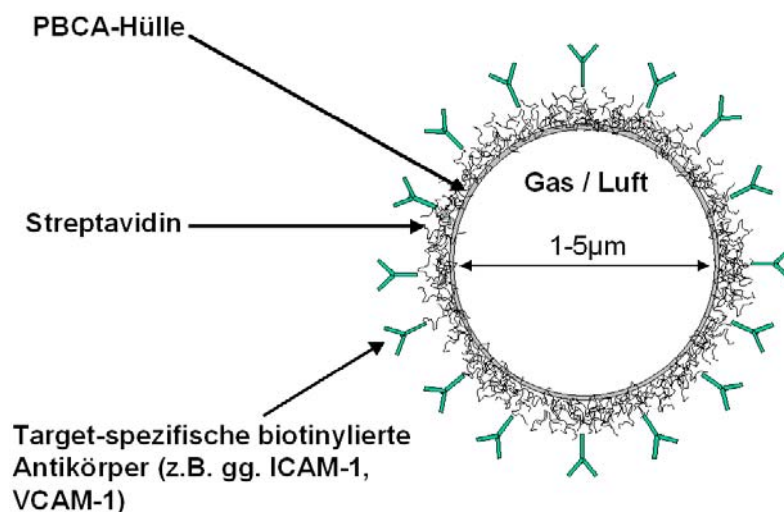


Abb. 3:

Aufbau target-spezifischer Ultraschallkontrastmittel (Mikropartikel, MP):

Die zwischen 1 und 5 Mikrometer im Durchmesser großen, gas-oder luftgefüllten MP bestehen aus einer PBCA-Hülle (Polymere bestimmter Cyanoacrylate) und sind in einem Kopplungsschritt mit Streptavidin an der Oberfläche bestückt. Über die Affinität von Biotin zu Streptavidin lassen sich durch Inkubation mit biotinylierten Antikörpern molekül- oder target-spezifische MP herstellen.

1.4.2.3. Ultraschall-basierte Abbildung von Adhäsionsmolekülen bei der EAE

In ersten Studien mit ICAM-1-gekoppelten USKM konnte bei der EAE der Ratte spezifisch die ICAM-1-Expression an der Blut-Hirn-Schranke dargestellt werden.

Anhand der erhobenen Daten ist es möglich, in Übereinstimmung mit immunhistologischen Untersuchungen Aussagen über das Ausmaß und die Lokalisation der Entzündungsherde bei der EAE zu machen (Reinhardt et al., 2005).

Die klaren Größenunterschiede zwischen dem Signal der ICAM-1 MP in kranken Tieren und dem Signal in gesunden Tieren bzw. demjenigen von Kontroll-MP in kranken Tieren belegen die hohe Spezifität der verwendeten Methode beim Monitoring von ICAM-1 im ZNS.

1.4.2.4. Quantifizierung von Adhäsionsmolekülen bei der EAE mit der SPAQ-Technologie

Für den präklinischen bzw. klinischen Einsatz einer solchen Methode muss zusätzlich die Quantifizierbarkeit der Signale durch die Erfassung der Signalstärke gefordert werden, mit dem Ziel, intraindividuelle Verläufe und interindividuelle Unterschiede im Expressionslevel eines Moleküls erfassen zu können. Innerhalb der letzten Jahre wurde eine Technik entwickelt und etabliert, die die Quantifizierung von SAE-Signalen ermöglicht und den Ansprüchen an ein modernes molekulares Bildgebungsverfahren gerecht wird (Reinhardt et al., 2005).

Die „Sensitive Particle Acoustic Quantification“ (SPAQ) – Technologie basiert auf der Idee, das Zielgewebe bzw. Zielorgan nacheinander in dünnen Schichten mit dem

Ultraschall abzutasten. Dies bietet den entscheidenden Vorteil, wesentlich kleinere Volumina und damit geringere MP-Mengen quantifizieren zu können als dies bei der Erfassung des gesamten Gewebes zu einem einzigen Zeitpunkt der Fall wäre. In Validierungsexperimenten an Agargelphantomen konnten Partikelkonzentrationen, die den oben genannten, bisherigen Grenzwert bis um das 30fache übersteigen, zuverlässig und exakt bestimmt werden. (Reinhardt et al., 2005)

In Versuchen zur Quantifizierung von ICAM-1 bei der EAE ex vivo mit der SPAQ-Technologie konnte nachgewiesen werden, dass ein großer Unterschied in der ICAM-1 Expression kranker Tiere und gesunder Kontrollen besteht. Gleichzeitig wurde der Beweis für die Spezifität der Methode erbracht und die hohe Sensitivität durch quantitative Unterschiede in der ICAM-1 Expression nach Kortikosteroid-Behandlung EAE-kranker Tiere gezeigt (Reinhardt et al., 2005).

Erste Pilotexperimente mit der SPAQ-Technologie in vivo machten deutlich, dass die Quantifizierung des spezifischen Signals auch durch die intakte Kalotte, d.h. in vivo möglich ist und dass damit eine weitere wesentliche Anforderung an ein molekulares Bildgebungsverfahren erfüllt ist (Reinhardt et al., 2005).

Durch den Nachweis VCAM-1 spezifischer Kontrastmittelsignale bei der EAE konnte das Potential der SPAQ-Technologie als Plattform-Technologie demonstriert werden, so dass in Zukunft eine Reihe weiterer endovaskulärer Moleküle mit dieser Methode untersucht und quantifiziert werden können (Reinhardt et al., 2005).

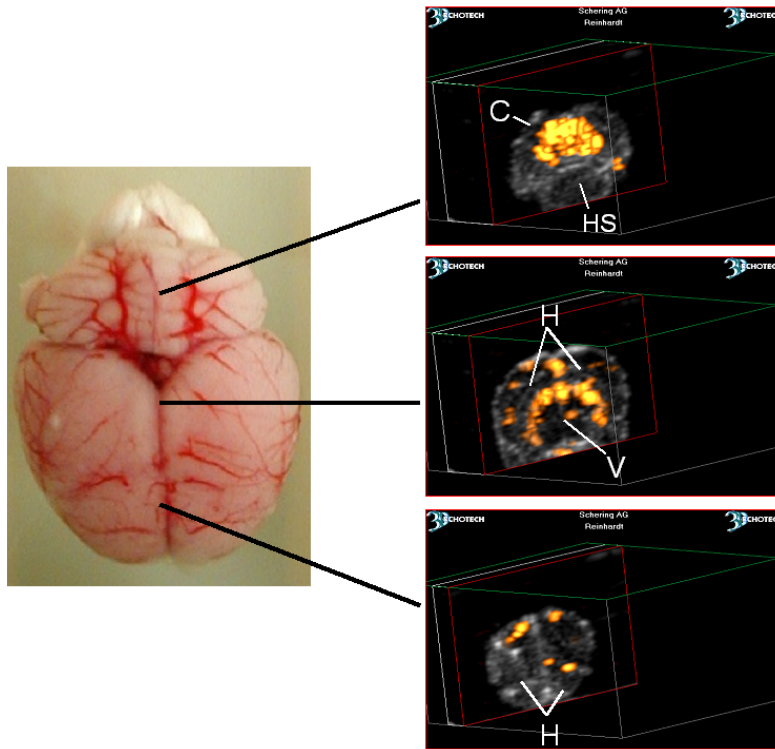


Abb. 4:
 Einzelbilder einer SPAQ-Untersuchung des Gehirns (ex vivo) bei AT-EAE mit ICAM-1-spezifischen MP. Die ICAM-1 spezifischen SAE-Signale stellen sich gelb-orange dar. Regionen mit hoher ICAM-1 Expression bei der AT-EAE sind das periventrikuläre Gebiet (Mitte rechts) sowie das Kleinhirn und der Hirnstamm (oben rechts). Im Bereich des Frontalhirns (unten rechts) sind nur vereinzelt spezifische SAE-Signale sichtbar. Die hohe Auflösung der Methode erlaubt ausserdem die anatomische Abgrenzung von Hemisphären (H), Ventrikeln (V) , Kleinhirn (C) und Hirnstamm (HS).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Ziel des Projektes ist es, mithilfe der ultraschall-basierten molekularen Bildgebung die zeitliche Expression von Adhäsionsmolekülen im Verlauf der AT-EAE zu untersuchen und die Kinetik des molekularen Expressionsmusters an der Blut-Hirn-Schranke mit dem Krankheitsverlauf als auch mit der Histopathologie der EAE-Läsionen in Beziehung zu setzen. Die Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates sollen im Krankheitsverlauf untersucht und der funktionelle Zusammenhang zur Kinetik der Adhäsionsmolekülexpression hergestellt werden. Auf diese Weise sollen neue Erkenntnisse über die pathogenetische Rolle von Adhäsionsmolekülen in vivo gewonnen werden.

Die SPAQ-Technologie bietet die Möglichkeit, die Regulation von Adhäsionsmolekülen im lebenden Organismus darzustellen und zu quantifizieren. Nach unserer Kenntnis ist dieses ultraschall-basierte Verfahren derzeit die einzige Methode, die über ein ausreichendes Potential verfügt, um eine solche Aufgabe zu erfüllen. Die SPAQ-Technologie hat vor allem im Vergleich zum Standard MRT eine überlegene Sensitivität. Bereits ein Partikel führt innerhalb eines Voxels zur Generierung eines starken Signals. Diese Eigenschaft besitzt zur Zeit kein MRT-Kontrastmittel. Zwar können mit der Hochfeldtechnologie die Voxelgrößen deutlich reduziert werden, dies führt jedoch zu einer erheblichen Verlängerung der Messzeiten, die die Hochfeld-MRT für das molekulare in-vivo-Monitoring derzeit nicht praktikabel erscheinen lassen. Die PET hat zwar ebenfalls den Vorteil einer hohen Sensitivität erscheint jedoch aufgrund ihrer geringen Raumauflösung derzeit im Kleintierbereich noch nicht für alle Fragestellungen geeignet. Aus diesem Grund halten wir die SPAQ-Technologie für ein sehr gutes Verfahren, um diese im Bezug auf die Multiple Sklerose immunologisch relevante Fragestellung zu beantworten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Lymphozyten-Zelllinien

Die zur Induktion einer adoptiv-transfer EAE verwendeten enzephalithogenen, antigen-spezifischen T-Lymphozyten wurden aus den Lymphknoten von zuvor mit MBP des Meerschweinchens (gpMBP) und komplettem Freund'schen Adjuvans aktiv immunisierten, weiblichen Lewis-Ratten gewonnen (nach Gold et al., 1995).

2.1.2. Chemikalien und Reagentien

- Avidin-Biotin-Blocking-Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
- Bovines Serumalbumin, BSA – Trockensubstanz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- ConA-Ü, Interleukin-2-haltiger Überstand Concanavalin A-stimulierter Milzen der Maus	hergestellt im Labor der Klinischen Forschungsgruppe für MS und Neuroimmunologie der Universität Würzburg
- 3,3 Diaminobenzidin-tetrachlorid-dihydrate, DAB Tabletten à 10mg	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Kopenhagen- Dänemark
- Deoxyribonuclease I	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- DMSO (Dimethylsulfoxid)	C. Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- EH-Medium	hergestellt aus 25ml 1M Hepes Puffer auf 10l Aqua dest., 1h rühren, pH 7,4 einstellen mit 1N NaOH

- FACS-Puffer	hergestellt aus PBS, 1% FCS und 0,1% Natrium-Azid
- FCS, „foetal calf serum“	PAA Laboratories GmbH, Österreich aufgetaut und inaktiviert durch Erhitzen auf 56°C für 30 Minuten
- FoxP3 APC anti-mouse/rat staining set	ebioscience, über Fa. Natutec, Frankfurt a. M.
- gpMBP, „guinea pig - myelin basic protein“, Aliquots mit 2mg/ml	extrahiert aus Meerschweinchenhirn im Neuroimmunologischen Labor der Klinischen Forschungsgruppe für MS der Universität Würzburg
- Hepes-Puffer, 1M	Invitrogen/Gibco, USA
- Histowax tissue embedding medium	Histolab Products AB, Schweden
- Ketaminhydrochlorid, „Ketanest“	WTD, Garbsen, Deutschland
- L-Glutamin, 200mM	Invitrogen/Gibco, USA
- Liberase	Roche AG, Basel, Schweiz
- Lymphoprep	Axis-Shield PoC AS, Norwegen
- PBS-Waschpuffer 1M (phosphate buffered saline)	NaCl 80g/l, KCl 2g/l, Na ₂ HPO ₄ 14,2g/l, NaH ₂ PO ₄ 13,8g/l, eingestellt auf pH 6,7
- Penicillin/Streptomycin 10g/ml	Biochrom AG, Berlin
- Percoll	Amersham Biosciences AB, Sweden
- RatReMed – Restimulationsmedium	hergestellt aus je 1% Glutamin, Penicillin/Streptomycin, Rattenserum und 0,4% Mercaptoethanol auf RPMI; Sterifiltration mit 0,20µm

	bottle-top-filter
- RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Zellkulturmedium	hergestellt aus 104,3g RPMI + 22g NaHCO ₃ auf 10 l Aqua dest., 1h rühren, pH 7,4 einstellen mit 1N HCl, sterifiltriert mit 0,2µm Nalgene-bottle-top-filter
- StreptABComplex-Kit (Streptavidin, biotinylierte Peroxidase)	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
- TBS-Waschpuffer (tris buffered saline)	60ml 5M NaCl (=150mM) + 100ml 1M Tris (=50 mM), auffüllen auf 2l mit Aqua dest.
- TCGF-Medium, „T-cell-growth-factor“	hergestellt aus je 1% Glutamin und Penicillin/Streptomycin, 5% FCS und 7,5% ConA-Ü auf RPMI; Sterifiltration mit 0,45µm bottle-top-filter
- Tissue-Tek O.C.T. Compound (Einbettmittel)	Sakura Finetek, NL
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan, Tris-Puffer	Merck, Darmstadt
- Trypanblau	Fluka Chemie AG, Schweiz
- Ultraschall-Kontrastmittel	Schering AG, Berlin
- Vitro-Clud-Einschlußmedium	R. Langenbrinck, Emmendingen
- Xylazinhydrochlorid, „Rompun“	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
- Xylol, absolut, p.a.	J.T. Baker, Niederlande

2.1.3. Antikörper

Antigen	Re-aktivität	Klon	Herkunft	Isotyp	Konzentration	Form / Konjugation	Hersteller
CD3	Ratte	G4.18	Maus	IgG3κ	0,2 mg/ml	R-PE	BD Biosciences Pharmingen, Europa
CD4	Ratte	15-8 ²	Maus	IgG1	0,5 mg/ml	unkonj.	Holland biotechnology bv
CD4	Ratte	OX-38	Maus	IgG2a κ	0,2mg/ml	R-PE	BD Biosciences Pharmingen, Europa
CD8	Ratte	R1-10B5	Maus	IgG2a	0,5 mg/ml	unkonj.	Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan
CD8a	Ratte	OX-8	Maus	IgG1κ	0,2mg/ml	PerCP	BD Biosciences Pharmingen, Europa
CD25	Ratte	OX-39	Maus	IgG1κ	0,5 mg/ml	FITC	BD Biosciences Pharmingen, Europa
CD28	Ratte	JJ319	Maus	IgG1κ	0,5 mg/ml	FITC	BD Biosciences Pharmingen, Europa
CD54 (ICAM-1)	Ratte	1 ²⁹	Maus	IgG1κ	0,5 mg/ml	Biotin NA/LE	BD Biosciences Pharmingen, Europa
CD 106 (VCAM-1)	Ratte	MR106	Maus	IgG1κ	0,5 mg/ml	unkonj. Biotin	BD Biosciences Pharmingen, Europa
FoxP3	Ratte/ Maus	FJK-16s	Maus	IgG2a	0,2mg/ml	APhC	Ebioscience, Ca., USA
IgG (Schwer- und Leichtketten)	Maus		Pferd	IgG1	0,5 mg/ml	Biotin	Vector Laboratories, Inc., USA

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Antikörper: CD = cluster of differentiation, FoxP3 = Forkhead Box Protein 3, IgG = Immunglobulin gamma, R-PE = R-Phycoerythrin, PerCP = Peridinin Chlorophyll a Protein, FITC = Fluorescein Iso-Thiocyanate, APhC = Allophycocyanin

2.1.4. Geräte

- Axioplan 2 Fotomikroskop	Zeiss, Jena
- Cryostat Leica CM 3050 S	Leica, Wetzlar
- Digitalkamera Insight4	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA
- FACS-Calibur Durchflusszytometer	BD Biosciences
- Foto-Bearbeitungsprogramm MetaView 6.3r2	Molecular Devices, Downingtown, PA, USA
- Langhaarschneider ermila magnum handy	Wahl Deutschland GmbH, Fernwald
- Perfusionspumpe Reglo Analog MS-2/8 C	Ismatec SA. Glattbrugg- Zürich, Schweiz
- Röntgenbestrahlungsgerät RT 200 (30Gy/15min)	C. H. F. Müller, Hamburg
- Sektorschallkopf S12	Philips Medical Systems, Hamburg
- Software zur Auswertung der Ultraschalldaten FreeScan V 7.09 / Quanticon	3D-Echotech, GE Medical Systems
- Software für Digitalkamera SPOT 4.1	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA
- Ultraschallgerät M2424R	Phillips Medical Systems, Andover, MA, USA
- Vorschubapparatur Motor Controller 500	Owis GmbH, Staufen, Germany

2.1.5. Verbrauchsmaterialien

- Aquaflex ultrasound gel pad 2 x 9 cm	Parker Laboratories, Inc. Fairfield, NJ, USA
- Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Roche AG, Basel, Schweiz
- BD Microlance 3 Injektionskanülen 23G	Becton Dickinson
- Eucerin pH5 Pflegesalbe	Beiersdorf, Hamburg
- Omnifix-F 1ml-Einmalspritzen mit Kanüle	B. Braun, Meisungen

- Pilca med Creme
 - SuperFrost Plus Objektträger (beschichtet)
 - Tissue-Tek Cryomold Einbettbehältnisse
(verschiedene Größen)
 - Triton X-100
 - Ultraschall-Kontaktgel
 - Videocassetten Betacam SP
 - Zellkulturschalen 100 x 20 mm
- Asid Bonz, Herrenberg
 - R. Langenbrinck, Teningen
 - Sakura Finetek, NL
 - Sigma, Steinheim
 - Caesar u. Loretz, Hilden
 - Sony Corp., Tokyo, Japan
 - Sarstedt, N.

2.2. Methoden

2.2.1. Tiere

Eine EAE wurde in weiblichen Lewis Ratten, (Harlan/Winkelmann, Borcheln; Charles River, Sulzfeld) induziert. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Experimente 6 - 8 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 100 - 160g. Sie wurden in Käfigen zu je 5 Tieren in klimatisierten Tierlabors mit Lichtsteuerung und Schleusen gehalten. Nahrung und Wasser standen ihnen ohne Einschränkungen zur Verfügung. Die Tiere wurden nach Lieferung eine Woche zur Eingewöhnung im Käfig belassen, bevor eine EAE induziert wurde.

Es lag eine behördliche Genehmigung für alle Tierversuche vor (verantwortlicher Versuchsleiter: PD Dr. M. Mäurer)

2.2.2. MBP-spezifische adoptive-transfer EAE (AT-EAE)

2.2.2.1. Restimulation enzephalithogener T-Lymphozyten und Induktion der MBP-AT-EAE

Um die T-Lymphozyten bereits bestehender Zelllinien wieder zur Induktion einer AT-EAE zu befähigen, bedarf es einer Restimulation der Lymphozyten mit proliferationsfördernden Zytokinen sowie der erneuten Exposition mit dem spezifischen, enzephalithogenen Protein oder Antigen.

Dazu wurden zunächst aus einem früheren Restimulationszyklus stammende T-Lymphozyten aus dem Stickstofftank entnommen und sofort nach dem zügigen Auftauen im Wasserbad in ein 50ml Röhrchen überführt und vorsichtig mit 10ml EH-Medium pro Röhrchen suspendiert. Die rasche Trennung der Zellen vom im Einfriermedium enthaltenen DMSO erfolgte durch 10-minütige Zentrifugation der Suspension bei 1200 U/min und 4°C, womit eine ausreichend hohe Zellausbeute erreicht

wurde. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in Ratten-Restimulationsmedium (RatReMed) resuspendiert. Anschließend wurde ein Gemisch aus 10µl Zellsuspension und 10µl Trypanblau in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop bei 10facher Vergrößerung zur Bestimmung der absoluten Zahl vitaler Lymphozyten ausgezählt.

Als antigen-präsentierende Zellen (APC) wurden Thymozyten aus frisch und unter sterilen Bedingungen entnommenen Thymi syngener 4-8 Wochen alter Lewis-Ratten gewonnen. Die Thymi wurden mit einem Spritzenstempel durch ein Metallsieb gepresst und die so gewonnenen Thymozyten in EH-Medium suspendiert und anschließend 10 Minuten bei 1200 U/min und 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 3000 rad röntgenbestrahlt, wodurch die weitere Proliferation der Thymozyten verhindert wird, ohne dass sich die Fähigkeit zur Antigenpräsentation ändert. Nach Resuspension in RatReMed wurde die Gesamtmenge der APCs wie oben erläutert mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für die eigentliche Restimulation der T-Lymphozyten (Blastentransformation und Proliferation) wurde ein Gesamtansatz bestehend aus T-Zellen, APCs, gpMBP und RatReMed hergestellt, wobei die Menge der einzelnen Komponenten so berechnet wurden, dass 3×10^6 Lymphozyten zusammen mit $1,5 \times 10^8$ APCs und 100µg gpMBP in 10ml RatReMed in jeweils eine Zellkulturschale mit 10cm Durchmesser pipettiert werden konnten. Anschließend wurden die Ansätze im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden erfolgte in jede Zellkulturschale die Zugabe von 3ml TCGF, einem T-Zell-Wachstumsmedium, welches als Proliferationsstimulans den Interleukin-2-haltigen Überstand antigen-stimulierter Mäusemilz-Lymphozyten enthält. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellsuspensionen in 50ml Falcon Röhrchen pipettiert, 10 Minuten bei 1200 U/min und 4°C zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes das Pellet in jedem Röhrchen mit je 5ml 4°C kalter Lymphoprep-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde vorsichtig mit je 2ml EH-Medium überschichtet, wobei darauf zu achten war, dass sich die Zellsuspension und das EH-Medium dabei nicht vermischen. Die Röhrchen wurden nun für 25 Minuten bei 3000 U/min und 4°C mit ungebremstem Rotorauslauf zentrifugiert, wobei sich entlang eines Dichtegradienten die vitalen Lymphoblasten in der sog. Interphase zwischen Lymphoprep-Medium und EH-Medium sammelten. Diese Interphase wurde mit einer

Pipette entnommen, in EH-Medium suspendiert und erneut zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet bestehend aus MBP-spezifischen CD4⁺-T-Lymphoblasten wurde in EH-Medium resuspendiert.

Zur Induktion einer MBP-AT-EAE wurde den Ratten unter Äthernarkose ca. 1 ml Zellsuspension mit 4-6 x 10⁶ Zellen zur Induktion einer schwachen und 8-12 x 10⁶ Zellen zur Induktion einer schweren EAE in die Schwanzvene injiziert.

Bei Überschuss an T-Lymphoblasten wurden diese entweder als voraktivierte und damit schnell verfügbare Lymphoblasten in RPMI mit 40% FCS und 10% DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren oder erneut in TCGF-Medium kultiviert, um nach weiteren 3 Tagen als T-Lymphozyten für einen späteren Restimulationszyklus ebenfalls eingefroren zu werden.

2.2.2.2. EAE: Erfassung von Krankheitsaktivität und -verlauf

Die MBP-AT-EAE verläuft monophasisch. Beginnend mit Gewichtsverlust kommt es am zweiten oder dritten Tag nach Injektion der Lymphoblasten zu einer Schwanzlähmung und nach kranial fortschreitenden motorischen Ausfällen sowie einer Ataxie, um spätestens am fünften Tag, je nach der Zahl übertragener T-Zellblasten, mit einer mäßigen bis schweren Paraparese ihr Maximum zu erreichen. Im weiteren Verlauf klingen die Symptome über mehrere Tage bis zur vollständigen klinischen Remission ab. Nur bei sehr hoher Zellzahl versterben die Ratten an den Folgen der AT-EAE. Die Zellzahl-Wirkungsbeziehung war bereits zuvor ermittelt worden, um die geeignete Zelldosis für die Erzeugung einer mittelschweren AT-EAE verwenden zu können. Die Tiere wurden erstmalig vor Injektion der enzephalitogenen T-Zellen und dann täglich gewogen und auf klinische Symptome hin untersucht. Die klinische Bewertung der Schwere der EAE erfolgte anhand einer im Labor etablierten 10-stufigen Bewertungsskala (Hartung et. al. 1988), dem sog. EAN-Score (Experimentelle Autoimmune Neuritis). Dieser wird im Folgenden als EAE-Score oder Krankheits-Score bezeichnet werden.

Klinischer
Schweregrad

- 0** **keine Symptome**
- 1** **leichte Parese des Schwanzes**, Schwanzspitze schleift auf dem Boden
- 2** **vollständige Schwanzlähmung**, gesamter Schwanz schleift auf dem Boden
- 3** breitbeiniger Gang, leichte **Ataxie**
- 4** **milde Paraparese**, breitbeiniger **ataktischer Gang**, **Hintern tief**
- 5** Beim Laufen öfter oder ständig **Wegklappen eines Beines nach hinten**, das Bein kann jedoch wieder vollständig nach vorne gebracht werden
- 6** **mäßige Paraparese**, ein Bein konstant hinten oder beide Beine inkonstant hinten, Gang im Spagat
- 7** **Paraplegie**, beide Beine werden hinter dem Körper hergezogen, Gang mit den Vorderbeinen
- 8** **beginnende Teraparese**, erschwertes Voranziehen mit den Vorderbeinen
- 9** **schwere Tetraparese**, Atemnot, moribund
- 10** **gestorben**, getötet wegen des Zustandes

2.2.3. Gewebegewinnung und –aufbereitung

Parallel zur sonographischen Abbildung und Quantifizierung der Adhäsionsmolekülexpression erfolgte die histologische Kontrolle der Adhäsionsmolekülexpression und der zellulären Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates zu den folgenden Zeitpunkten:

- Tag 2 (erste klinische Symptome),
- Tag 4 (klinisches Maximum),
- Tag 5 (frühe Remission) und
- Tag 7 (späte Remission)

Die Tieren wurden an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten mittels CO₂ getötet. Gehirn und Rückenmark wurden innerhalb von 10 Minuten entnommen. Die entnommenen Organe wurden kurz in PBS-Puffer gewaschen.

Anschließend wurde das Gehirn durch Schnitte 8 mm caudal des Frontalpols, etwa auf Höhe des dritten Ventrikels und 11mm caudal des Frontalpols, etwa auf Höhe des Überganges zum Kleinhirn sowie in der Mitte des sagittalen Kleinhirndurchmessers scharf durchtrennt.

Das Rückenmark wurde mit Orientierung an den Intumeszenzen in ein zervikales, ein thorakales und ein lumbales Rückenmark unterteilt und diese Abschnitte wiederum in jeweils 2-3 Sektionen zerteilt.

Schließlich wurden die einzelnen Abschnitte von Gehirn und Rückenmark mit TissueTek-Einbettmedium überschichtet und in einem Gefäß mit stickstoffgekühltem Methylbutan durch Eintauchen schockgefroren. Die Gewebe wurden anschließend bis zur Herstellung der Gefrierschnitte bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Die Gefrierschnitte wurden mit einer Schichtdicke von 10µm hergestellt und auf vorbeschichtete Objektträger aufgenommen.

2.2.4. Immunhistochemie

2.2.4.1. Immunhistochemische Färbung von ICAM-1 und VCAM-1

Die Gefrierschnitte wurden zunächst luftgetrocknet, danach 10 Minuten in -20°C kaltem Aceton fixiert und anschließend wieder getrocknet und in TBS-Puffer gespült. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Blockade unspezifischer Eiweißbindungsstellen mit 10% BSA. Nach Entfernung des BSA wurde ein biotinylierter anti-ICAM-1-Antikörper bzw. ein nativer VCAM-1 Antikörper in 100facher Verdünnung in 1%iger BSA-TBS Lösung auf die Schnitte pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Schnitte mit TBS-Puffer gewaschen. Abschließend erfolgte eine Blockade der gewebeeigenen Peroxidasen durch 15 – 20 minütige Inkubation mit Methanol/Wasserstoffperoxid.

Im Falle der VCAM-1-Färbung erfolgte noch die einstündige Inkubation (RT) mit einem biotinylierten Sekundärantikörper in 200facher Verdünnung.

Dann erfolgte die Inkubation mit einem Avidin-Biotin-Komplex für 35 Minuten bei RT. Die in diesem Komplex an Biotin gekoppelte Peroxidase ist als Enzym für die eigentliche Färbereaktion des Chromogens DAB verantwortlich. Nach Waschen wurde der Farbstoff, DAB, auf die Schnitte pipettiert. Nach 10 Minuten wurde die Färbereaktion in zweifach destilliertem Wasser abgestoppt.

Zum Schluß wurden die Zellkerne mit Hämalaun n. Meyer für 20 Sekunden gegengefärbt

Auf die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe folgte die Eindeckelung mit Vitroclud-Eindeckmedium.

2.2.4.2. Charakterisierung und Quantifizierung der entzündlichen Aktivität

Immunhistologische Charakterisierung der Entzündungsaktivität

Um die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates im Verlauf der EAE charakterisieren zu können, wurden wiederum Gefrierschnitte der verschiedenen Gehirn- und Rückenmarks-Abschnitte der Tage 2, 4, 5 und 7 nach Krankheitsinduktion auf CD4- und CD8-positive Zellen gefärbt.

Analog zu den beschriebenen Adhäsionsmolekülfärbungen wurden die Gefrierschnitte zunächst wie oben acetontfixiert und getrocknet. Als Waschpuffer wurde PBS-Puffer verwendet. Der BSA-Block mit 10%iger BSA-Lösung erfolgte bei der CD4-Färbung 20 Minuten und bei der CD8-Färbung 40 Minuten. Der Primärantikörper gegen CD4-Moleküle (15-8²) wurde in einer 8000fachen Verdünnung in 1%iger BSA-Lösung in PBS-Puffer für 1 Stunde bei 37°C, der Primärantikörper gegen CD8-Moleküle (R1-10B5) in 100facher Verdünnung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen in PBS-Puffer wurde bei beiden Färbungen zur Hintergrundreduktion ein Avidin-Biotin-Block mit 20 Minuten Inkubationszeit je Reagenz eingesetzt. Als nächster Schritt nach dem erneuten Waschen folgte ein Peroxidaseblock wie oben beschrieben für 15 Minuten. Daraufhin wurde wieder gewaschen und mit dem jeweiligen biotinylierten Sekundärantikörper in 200facher Verdünnung bei beiden Färbungen für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die verbleibenden Schritte wurden wie bei der Adhäsionsmolekülfärbung beschrieben durchgeführt, wobei die Einwirkzeit des DAB auf 7 Minuten reduziert wurde, um die noch vorhandene unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren.

Quantifizierung der Entzündungsaktivität im zeitlichen Verlauf

Nach der im eigenen Labor entwickelten, einfachen semi-quantitativen Methode (Linker et al., 2002) wurde die entzündliche Aktivität im Verlauf der EAE folgendermaßen semiquantitativ bestimmt:

Die CD4- und CD8-positiven Zellen wurden an zervikalen, thorakalen und lumbalen, entsprechend immunhistochemisch gefärbten Rückenmarksschnitten ausgezählt. Unter dem Mikroskop wurden auf jedem Schnitt die zwei größten Infiltrate in der Übersichtsvergrößerung aufgesucht und dann die Zahl der CD4- bzw. CD8-positiven Profile in einem Gesichtsfeld bei 40facher Vergrößerung bestimmt. Aus den Zellzahlen beider Infiltrate wurde der Mittelwert gebildet.

2.2.5. Ultraschall-basierte In-vivo-Messung der Adhäsionsmolekül-Expression

Als Target-spezifisches USKM wurden ICAM-1- bzw. VCAM-1- gekoppelte, luftgefüllte Mikropartikel verwendet, deren Hülle aus dem Cyanoacrylatpolymer PBCA (Poly(butyl-2-cyanoacrylat)) besteht und mit Streptavidin beladen ist (Reinhard et al., 2005).

Das Zielgewebe wird auf einem fahrbaren Tisch mit einem einstellbaren Vorschub im Mikrometerbereich (zwischen 10 und 250µm pro Sekunde), der auch als SPAQ-Auflösung bezeichnet wird, gegen den Schallkopf bewegt. Signalgebend sind nur diejenigen Mikropartikel, die durch den Vorschub neu in das Ultraschallfeld gerückt sind und erstmals von Ultraschallwellen erfasst und auf diese Weise zerstört werden. Alle übrigen im Schallfeld befindlichen, aber schon vorher erfaßten MP sind bereits zerstört und erzeugen somit kein SAE-Signal mehr. Da unter Verwendung der SPAQ-Technologie stets nur eine der SPAQ-Auflösung entsprechende, neue Schicht des Zielgewebes erstmalig den Ultraschallwellen ausgesetzt wird, werden auch nur in diesem, einige µm dicken Bereich SAE-Signale erzeugt.

Die SPAQ-Technologie führt zu einer deutlichen Erhöhung der räumlichen Auflösung in Hinblick auf die Kontrastmittelkonzentration und -verteilung. Die räumliche Auflösung des Ultraschallbildes bleibt dabei unverändert, kann jedoch durch eine zusätzliche Überlagerung mit dem besser auflösenden B-Bild soweit gesteigert werden, dass anatomische Zuordnungen sehr gut möglich sind. Durch die von den MP emittierten SAE-Signale und deren Detektierung im Farbdopplermodus konnten auf diese Weise aktive Bereiche der Entzündung im ZNS dargestellt und quantifiziert werden.

2.2.5.1. Versuchsaufbau

Die Experimente wurden mit einem Philips M2424R Ultraschallgerät durchgeführt. Die Ultraschalluntersuchung erfolgte im Farbdopplermodus mit einem 12 MHz-Sektorschallkopf (S12). Am Ultraschallgerät wurden folgende Parameter gewählt:

Persistenz = 0;

Priorität = maximal;

Penetrationstiefe = 3 cm;

Focus = 2 cm;

Bildwiederholungsrate = 25 Hz;

Mechanischer Index = 1.6 – 1.7;

Der Schallkopf wurde mit einem Stativ in vertikaler Ausrichtung unterhalb eines fahrbaren Tisches fixiert. Die anästhesierten Tiere wurden in Rückenlage auf den Tisch gelegt (Abbildung 5). Zuvor erfolgte eine Rasur des Schädels. Schallkopf und der Schädel der Tiere waren über eine Konstruktion aus Ultraschall-Gelkissen, Ultraschall-Kontaktgel und Frischhaltefolie verbunden. Dies erlaubte ein kontrolliertes Gleiten des Tieres bzw. des Schädels in horizontaler Richtung über den unterhalb fixierten Schallkopf. Der Tisch wurde mit einem Positionierungssystem mit einem einstellbaren Vorschub im Mikrometerbereich (SPAQ-Auflösung) über den Schallkopf hinweg bewegt. Die Bildwiederholungsrate des Ultraschallgerätes war mit dem Vorschub des Tisches synchronisiert. Der Tisch wurde bei einer Bildwiederholungsrate von 25 Bildern / Sekunde um 250µm pro Bild weiterbewegt und somit bei jedem US-Bild eine Gewebeschicht von 250µm neu beschallt.

Das Ultraschallgerät ist mit einem Videorekorder und mit einem PC verbunden, so dass die gewonnenen Bilder während der Untersuchung sowohl auf Videoband als auf Festplatte aufgenommen wurden.

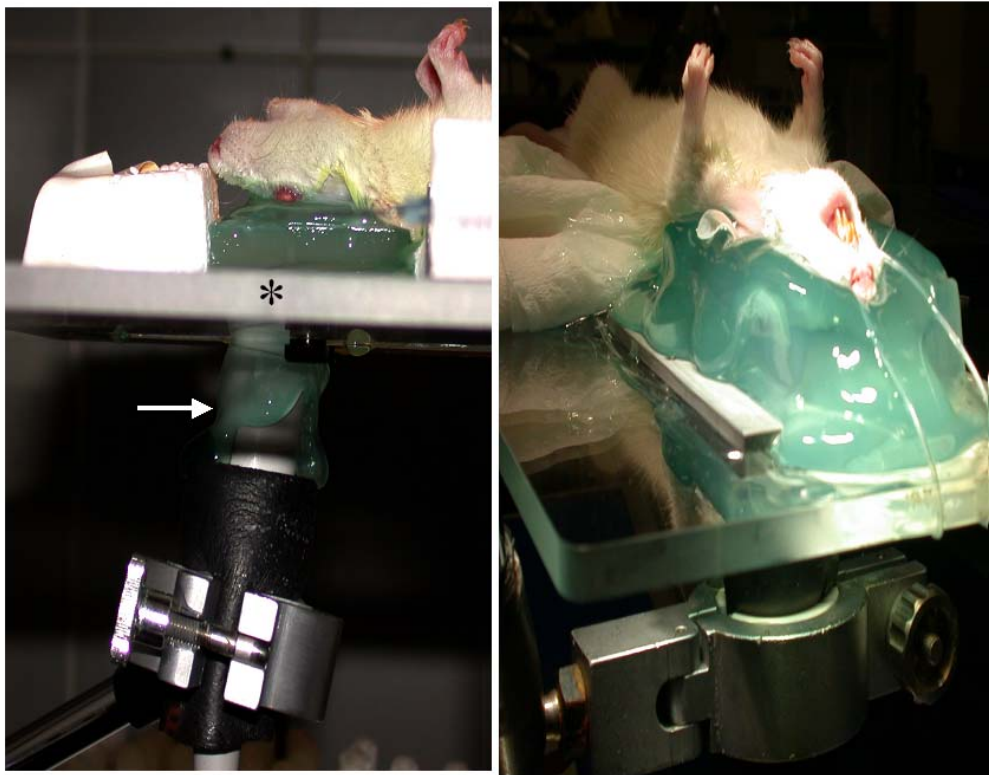


Abb. 5:
 Experimenteller Aufbau für die Ultraschallmessungen. Nach Entfernung der Schädelbehaarung wird die anästhesierte Ratte in Rückenlage auf einem fahrbaren Tisch (*) fixiert. Dieser kann während der Untersuchung mit einer der SPAQ-Auflösung entsprechenden Vorschubgeschwindigkeit gegen den Schallkopf (Pfeil) bewegt werden, der unterhalb des Tisches mittels eines Stativs fixiert ist. Dies erlaubt die Generierung und Aufzeichnung von SAE-Signalen in Schichtbildern des Gehirns.

2.2.5.2. Durchführung der in vivo US-Messungen

Es wurde ein USKM-Injektionsvolumen von $250\mu\text{l}$ / Tier (eigentliches Injektionsvolumen) entsprechend einer Kontrastmitteldosis von 5×10^8 MP / kg und $0,5\mu\text{g}$ des Antikörpers je 1×10^6 MP angesetzt.

Mikropartikel und Antikörper wurden in einem Eppendorf-Röhrchen für 10 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend mit einer Pufferlösung aus 1M PBS und 0,02% Triton aufgefüllt.

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von 100 mg / kg Ketanest (Ketamin) und 10 mg / kg Rompun (Xylazin) anästhesiert. Vor der ersten der sequentiellen US-Messungen wurde die Haare des Gehirnschädels der Tiere mit einem Langhaarschneider und Enthaarungscreme vollständig entfernt. Dieser Vorgang wurde bei den folgenden Messungen bei Bedarf wiederholt.

Das antigen-spezifische Kontrastmittel wurde in eine 1 ml-Einmalspritze aufgezogen und dem narkotisierten Tier mit einer 23G-Kanüle langsam und unter geringem Druck, um möglichst eine mechanische Zerstörung der MP zu vermeiden, in eine Schwanzvene injiziert.

Der Schädel der Tiere wurde mit Ultraschallkontaktgel bestrichen, welches zuvor durch Zentrifugation von kleinen Luftbläschen befreit wurde. Die Tiere wurden mit der dorsalen Seite nach unten, in Richtung Schallkopf, auf den positionierbaren Tisch gelegt und fixiert, um Bewegungsartefakte während der Messungen sicher zu verhindern.

7 Minuten nach Injektion des USKM wurde mit der Messung begonnen. Diese Latenz zwischen Injektion und Beginn der Untersuchung ergab sich aus Voruntersuchungen mit unkonjugierten MP, bei denen sich stabile Blutpoolwerte nach etwa sieben Minuten einstellten. Eine Messung bestand aus insgesamt 5 Durchläufen an jedem Tier. Während des ersten Durchlaufs wurden sowohl SAE-Signale, die von an ICAM-1- oder VCAM-1-gebundenen Mikropartikeln an den Gefäßwänden des Gehirns stammten als auch die von ungebunden im Blut der Gefäße zirkulierenden MP aufgezeichnet. Bei den weiteren 4 Durchläufen waren die spezifisch-gebundenen MP bereits zerstört und erzeugten somit auch kein SAE-Signal mehr. Diese 4 Durchläufe dienten zur Erfassung der MP, die nicht am Endothel gebunden sind und weiterhin im Blut zirkulierten. Durch Subtraktion des Mittelwerts dieser Blutpool-MP vom während des 1. Durchlaufes gemessenen Gesamtsignal konnte die Signalstärke nur der spezifisch-gebundenen MP ermittelt werden.

2.2.5.3. Auswertung

Die Summe der SAE-Signale („acoustic counts“) wurde mit der QuantiCon Software (3D-Echotech, GE Medical Systems) in der periventrikulären Region (ROI) bestimmt.

Zur Elimination des ZNS-Blutpools wurde der Mittelwert der Acoustic Counts der letzten 4 Durchläufe von der Messung der Acoustischen Counts der Ersten Messung abgezogen. Der Differenzbetrag entspricht der Anzahl der SAE-Signale, die von spezifischen Mikropartikeln stammen.

2.2.6. Durchflusszytometrie des ZNS zur Charakterisierung und Quantifizierung entzündlicher Infiltrate

Die Durchflusszytometrie von Hirn und Rückenmark bzw. Milz wurden an den Tagen 4 (Prämaximum), 5 (Maximum) und 6 (frühe Remission) durchgeführt. Für die Organentnahme wurden jeweils 3 bis 4 Tiere herangezogen, die in ihrem Krankheitsscore repräsentativ für das jeweilige Krankheitsstadium waren.

2.2.6.1. Gewinnung und Aufbereitung von Splenozyten und Lymphozyten des ZNS

Nach Tötung der Tiere wurden das gesamte ZNS und die Milz entnommen und kurz in PBS gewaschen.

Für die Gewinnung der Splenozyten wurden die Milzen mit einem 5ml Spritzenstempel in einem 40µm-Nylon-Zellsieb homogenisiert und mit PBS in ein 50ml Röhrchen gespült. Die Zellsuspension wurde mit 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, das Pellet nochmals in PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert.

Anschließend wurde das Pellet in 10ml PBS resuspendiert und vorsichtig auf 4ml kalte Lymphoprep-Lösung aufgetropft. Nach 20-minütiger Zentrifugation ohne Rotorbremse bei 2000 rpm und RT wurde die Interphase mit den vitalen Splenozyten abpipettiert, 2 mal in PBS gewaschen und nach Auszählung der Gesamtzahl der Zellen auf eine Konzentration von 20 Mio. Zellen / ml in FACS-Puffer verdünnt.

Gehirn und Rückenmark wurden mit PBS gewaschen. Eine Verdau-Lösung wurde hergestellt aus 5ml RPMI, 125µl Liberase und 7,5µl DNase je Tier. 1-2ml dieser

Lösungen wurden mit einer Spritze an mehreren Stellen in jedes Gehirn eingespritzt. Anschließend wurden Gehirn und Rückenmark der Tiere in die restliche Verdauungslösung gelegt und dort für 30 min bei 37°C inkubiert.

Das angebaute Gewebe wurde dann mit einem Homogenisator vollständig zerkleinert und mit PBS durch ein 70µm-Nylon-Zellsieb in ein 50ml Röhrchen gespült. Die Suspension wurde 5min bei 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet in 9ml Percoll pro Pellet bzw. pro Röhrchen vermischt, auf jeweils 30ml pro Tube mit PBS aufgefüllt und nach erneutem Mischen schließlich für 60 min bei 4000 rpm und 4°C ohne Abbremsung des Rotors zentrifugiert.

Der resultierende Gradient teilt sich auf in eine obere Myelinschicht, die vorsichtig abgesaugt wurde, eine hohe Zwischenschicht, die die Lymphozyten enthält und eine untere Schicht aus Erythrozyten und Zelldetritus. Die Lymphozytenschicht wurde in 50ml Röhrchen pipettiert und nach Abzentrifugation wurden diese in FACS-Puffer resuspendiert und auf eine Konzentration von 1 Mio. Zellen / 50µl verdünnt.

2.2.6.2. Färbung der Zellen

Die Lymphozyten wurden zunächst mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern gegen Markermoleküle bestimmter Lymphozytensubklassen gefärbt. Als Positivkontrolle dienten Splenozyten. CD3 wurde als pan-T-Zellmarker verwendet, CD4 als Marker für T-Helferzellen, CD8a als Marker für zytotoxische T-Zellen bzw. T-Suppressorzellen, CD25 als Aktivierungsmarker und CD28 als ein Markermolekül für Zellen mit kostimulatorischem Rezeptor zur Identifizierung CD28-negativer T-Suppressorzellen.

Jeweils 50µl Zellsuspension wurden in ein FACS-Röhrchen pipettiert und pro Gefäß jeweils 1µl des jeweiligen Antikörpers hinzupipettiert, wobei die Zellen in den folgenden Kombinationen gefärbt wurden:

FACS-Röhrchen	Färbung 1	Färbung 2	Färbung 3
1	ungefärbt		
2	CD4 (PE)	CD25 (FITC)	
3	CD3 (PE)	CD8a (PerCP)	CD28 (FITC)
4	Isotyp (PE)	Isotyp (PerCP)	Isotyp (FITC)
5	ungefärbt (Protokoll für intrazelluläre Färbung)		
6	CD4 (PE)	CD 25 (FITC)	(FoxP3-APhC im Rahmen der intrazellulären Färbeprozedur)
7	Isotyp (PE)	Isotyp (FITC)	Isotyp (APhC)

Tabelle 2: Antikörper (AK)-Kombinationen für die durchflusszytometrische Charakterisierung und Quantifizierung der Lymphozyten-Subklassen im ZNS. Die Bezeichnung des Klons, des Immunglobulinsubtyps sowie des Herstellers sind Tabelle 1 (Material) zu entnehmen. In Klammern sind die an die AK gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe angegeben: PE = R-Phycoerythrin, PerCP = Peridinin Chlorophyll a Protein, FITC = Fluorescein Iso-Thiocyanate, APhC = Allophycocyanin

Die Antikörper wurden 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und die Suspensionen daraufhin in FACS-Puffer gewaschen. Die Pellets in den Röhrchen 1 bis 4 wurden mit je 300µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C gelagert. Die weiteren Schritte für die Röhrchen 5 bis 7 wurden nach dem produkteigenen Protokoll für intrazelluläre Färbungen mit dem „ebioscience FoxP3 anti-rat/mouse staining set“ durchgeführt. Röhrchen 5 und 7 wurden, obwohl hier kein Antikörper gegen intrazelluläre Strukturen zum Einsatz kam, aus Gründen der Vergleichbarkeit der gleichen Prozedur unterzogen. Pro Röhrchen wurde 1ml der Fixations-/Permeabilisationslösung hinzugegeben, die zuvor aus 3 Teilen Fix.-/Perm.-Puffer und 1

Teil Fix./Perm.-Konzentrat hergestellt wurde, kurz mit dem Vortexer resuspendiert und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte ein 2maliges Waschen und Zentrifugieren mit jeweils 2ml des einfachen Permeabilisierungspuffers, hergestellt aus 10fachem Permeabilisierungspuffer durch Verdünnung mit destilliertem Wasser. Als weiterer Schritt wurde 1µl FoxP3-ApHC-Antikörper in Röhrchen 6 pipettiert, so dass sich hier die Markerkombination CD4 PE, CD25 FITC, FoxP3 ApHC ergab. Nach 30 min Inkubation bei 4°C im Dunkeln wurde 2 mal mit je 2ml Permeabilisierungspuffer gewaschen und zentrifugiert, und die Pellets schließlich in 300µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.6.3. Durchführung und Auswertung der FACS-Analyse

Für die durchflusszytometrische Aquirierung der Daten zu den drei verschiedenen Zeitpunkten wurden, um die Vergleichbarkeit der Daten untereinander zu gewährleisten, die Einstellungen in der Software des Durchflußzytometers am ersten Messtag gespeichert und bei den weiteren Messungen wiederverwendet. Anhand der Isotypenkontrollen erfolgte die Festlegung der Grenzen für die Messquadranten. Die Quantifizierung der Lymphozytensubklassen erfolgte durch Quadrantenanalyse mit der CellQuestPro-Software (BD Biosciences).

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von targetspezifischen USKM auf den Verlauf der AT-EAE

Für die molekulare Bildgebung mit targetspezifischen Ultraschallkontrastmitteln werden Antikörper-gekoppelte Mikropartikel verabreicht. Für Antikörper gegen das Adhäsionsmoleküle ICAM-1 konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, die EAE zu unterdrücken (Archelos et al., 1993). Daher untersuchten wir primär den Einfluss der USKM auf den Verlauf der EAE.

Abbildung 6 stellt den Krankheitsverlauf nach Gabe von ICAM-1-spezifischen MP im Vergleich zu unbehandelten Tieren dar. Die Krankheitsverläufe beider Gruppen zeigten keine Unterschiede, sodass davon ausgegangen werden kann, dass ICAM-1-gekoppelte MP selbst den Verlauf der EAE nicht beeinflussen und somit die gewonnenen Ergebnisse nicht systematisch verändert werden.

Dies hängt zum einen damit zusammen, dass bei den in-vivo-Messungen mit anti-ICAM-1-konjugiertem USKM deutlich geringere Mengen Antikörper eingesetzt werden, als für effektive Blockierungsexperimente verwendet worden waren (Archelos et al., 1993). Zum anderen muss von einer starken Anreicherung bzw. einem Pooling der MP in Organen des Retikuloendothelialen Systems (RES) wie Leber und Milz ausgegangen werden, was dazu führt, dass nur ein Bruchteil der injizierten Antikörpermengen die Blut-Hirn-Schranke überhaupt erreicht.

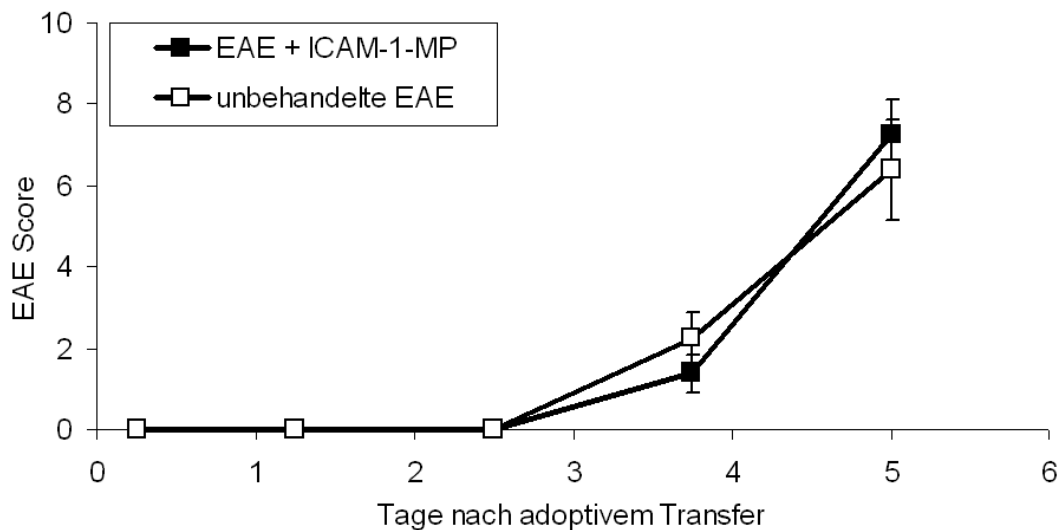


Abb. 6:
 Vergleich der Krankheitsverläufe von Tieren, die mit ICAM-1 spezifischen MP behandelt wurden (schwarz, n=5) und unbehandelten Tieren (weiß, n=5) bei AT-EAE. Beide Gruppen zeigen nach dem Auftreten erster Symptome nach etwa 60 Stunden einen vergleichbaren Verlauf. Daher kann angenommen werden, dass die Verwendung messungsrelevanter Dosen des anti-ICAM-1-AK keinen erkennbaren Effekt auf den Krankheitsverlauf der AT-EAE hat.

3.2. Sequentielle US-Untersuchung der ICAM-1- und VCAM-1-Expression bei der MBP-AT-EAE

Nach dem Zelltransfer entwickeln sich bei der AT-EAE nach 72h (Tag 3) die ersten klinischen Symptome, woraufhin es zu einer raschen Progression der Erkrankung bis zum Erkrankungsmaximum 96h (Tag 4) nach dem Zelltransfer kommt. 120h nach Induktion der Erkrankung (Tag 5) beginnen die Tiere, sich zu erholen (frühe Remissionsphase). Daraufhin sind die klinischen Symptome über 2 bis 3 Tage

rückläufig (späte Remissionsphase), 240h nach dem Zelltransfer (Tag 10) sind die Tiere in der Regel wieder völlig gesund (komplette Remission).

Bei der sequentiellen Untersuchung der molekularen Expression von ICAM-1 und VCAM-1 im Verlauf der MBP-AT-EAE zeigen sich zwei wesentliche Befunde:

- 1) die Aufregulation der Adhäsionsmoleküle geht den Symptomen der Erkrankung voraus und
- 2) die Expression der beiden Adhäsionsmoleküle erreicht ihr Maximum erst in der Phase der Remission, überdauert somit das Maximum der Erkrankung und zeigt eine verzögerte Rückkehr zu den Ausgangswerten.

Zunächst wurde die Adhäsionsmolekülexpression in der frühen Phase der Erkrankung bis zum Erkrankungsmaximum untersucht. Abbildung 7A gibt den Verlauf der Expression von ICAM-1 6h, 30h, 60h, 90h und 120h nach adoptivem Transfer wieder. Die Höhe der Expression von ICAM-1 wird durch die im periventrikulären Gehirn gemessene Signalstärke (*acoustical counts*) wiedergegeben. Abbildung 7B setzt dazu den Krankheitsverlauf der AT-EAE in Beziehung. In den ersten 30 Stunden nach Induktion der Erkrankung befindet sich die ICAM-1 Expression auf dem Baseline-Wert. Die Tiere zeigen zu diesem Zeitpunkt keine Symptome. Während die Tiere bis zum Zeitpunkt 60h nach dem Zelltransfer weiterhin asymptomatisch bleiben, steigt die Expression von ICAM-1 nach 30h bereits an und geht somit der Klinik der AT-EAE voraus. Wie erwartet verläuft daraufhin die ICAM-1-Expression mit der Entwicklung der klinischen Symptome der AT-EAE parallel.

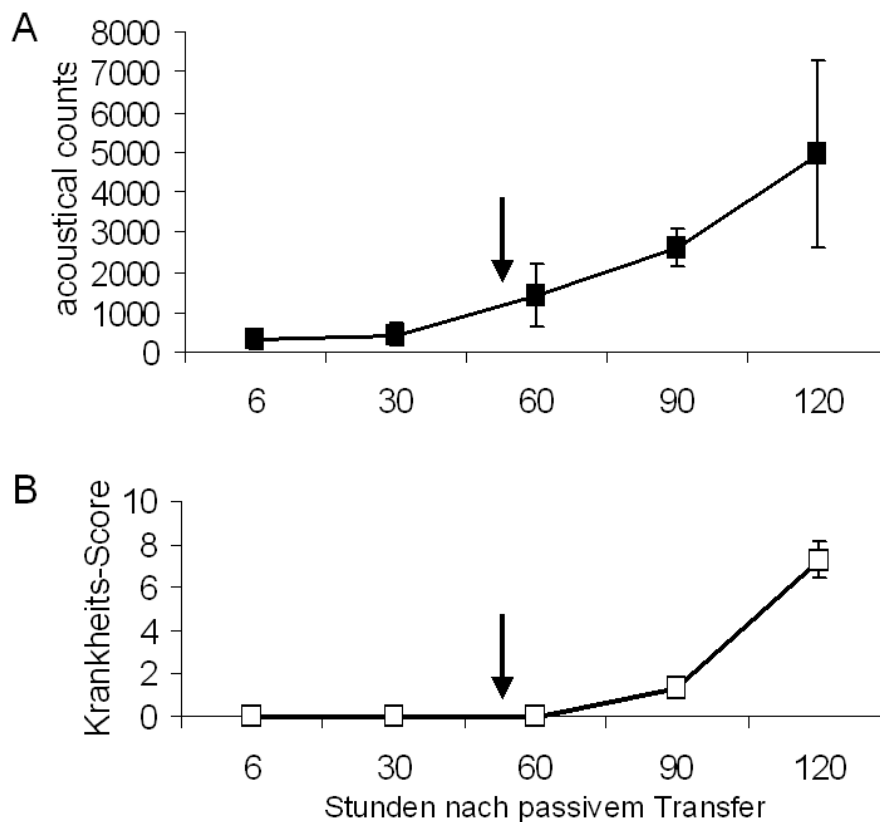


Abb. 7:
 Die Aufregulation von ICAM-1 bei der AT-EAE geht der Symptomatik der Erkrankung voraus. Abb. 7A zeigt die Expressionkinetik von ICAM-1 in der frühen Phase der AT-EAE. Die im Ultraschall gemessene Signalstärke ICAM-1-spezifischer SAE-Signale wird in *acoustical counts* angegeben und gibt die Höhe der Expression von ICAM-1 im periventrikulären Gehirn wieder. Abb. 7B setzt dazu den Krankheitsverlauf der Tiere in Beziehung (EAE-Score). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem ICAM-1 bereits aufreguliert wird, während die Tiere noch keine Krankheitssymptome zeigen.

Als nächster Schritt wurde die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 im periventrikulären Gehirn im Verlauf der AT-EAE untersucht. Entsprechend dem klinischen Verlauf wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle nach 0h, 6h (Tag 1), 72h (Tag 3), 120h (Tag 5), 168h (Tag 7) und 240h (Tag 10) mittels ICAM-1 bzw. VCAM-1-spezifischer MP im US quantifiziert. In Abbildung 8A ist der Verlauf der Adhäsionsmolekülexpression wiedergegeben, in Abbildung 8B dazu wiederum der Krankheitsverlauf der AT-EAE in Beziehung gesetzt. 0h und 6h nach Induktion der Erkrankung befindet sich die Expression beider Moleküle auf dem Ausgangsniveau.

Wie schon in den Untersuchungen der frühen Phase der AT-EAE gezeigt wurde, steigt die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 zu einem Zeitpunkt an, an dem die Tiere noch keine Krankheitssymptome zeigen (durchgehende Pfeile). Im weiteren Verlauf der Krankheitsprogression steigt die Adhäsionsmolekülexpression parallel mit der Zunahme klinischer Symptome der AT-EAE an. Interessanterweise kommt es nach dem Erkrankungsmaximum (etwa 96h nach Zelltransfer) nicht wie erwartet zu einem raschen Abfall der Adhäsionsmolekülexpression entsprechend der Rückbildung der klinischen Symptome. Vielmehr bleiben VCAM-1 und insbesondere ICAM-1 in der frühen Remission auf einem hohen Niveau aufreguliert (unterbrochene Pfeile). Ein Abfall der molekularen Expression beider Adhäsionsmoleküle auf Höhe der Ausgangswerte findet erst in der späten Remission statt.

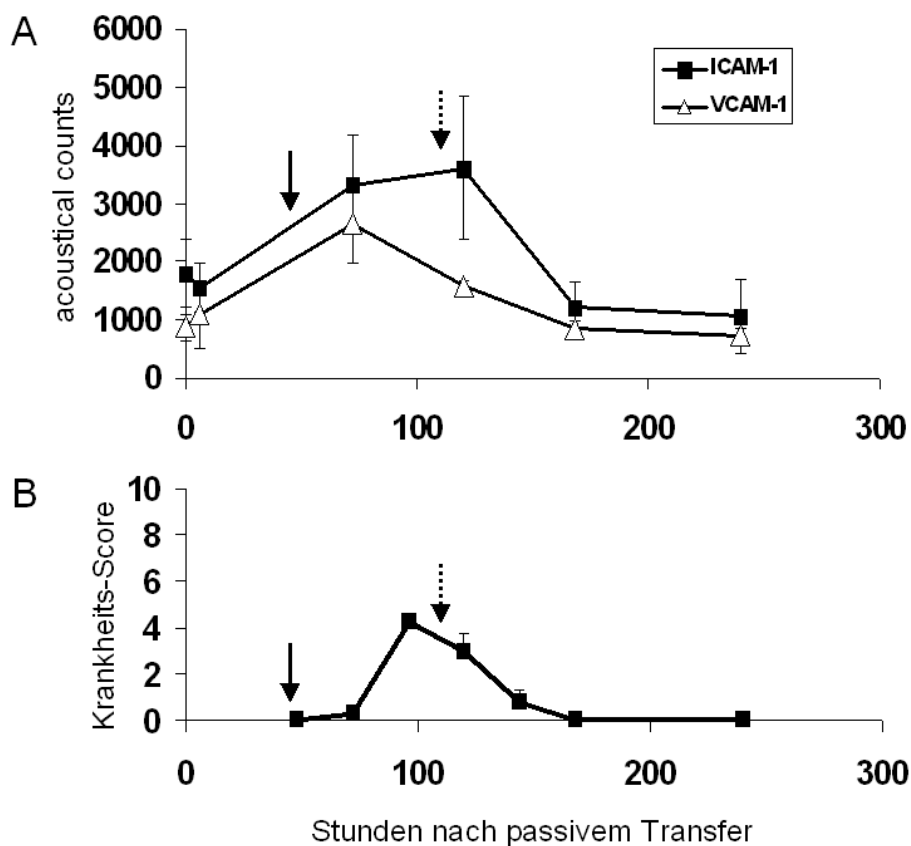


Abb. 8:

Regulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 bei AT-EAE. Die in vivo-Expression der Adhäsionsmoleküle wurde an den Tagen 0 (0h), 1 (6h), 3 (72h), 5 (120h), 7 (168h) und 10 (240h) nach Krankheitsinduktion untersucht. Die gemessenen Werte der Expression von ICAM-1 (schwarze Quadrate, n=4) und der VCAM-1 (weiße Dreiecke, n=4) werden in *acoustical counts* angegeben (Abb. 8A). In Abb. 8B wurde dazu die Krankheitsaktivität (EAN-Score) in Beziehung gesetzt (n=8). Beide Adhäsionsmoleküle werden bereits etwa 50 Stunden nach Induktion der Erkrankung vor dem Auftreten erster Symptome aufreguliert (durchgehende Pfeile). Während die klinischen Zeichen der EAE nach Überschreiten des Krankheitsmaximums rasch abnehmen, zeigen VCAM-1 und vor allem ICAM-1 weiterhin eine hohe Expression (unterbrochene Pfeile) und kehren erst in der späteren Phase der Remission zu den Ausgangswerten zurück.

Die Messung der Adhäsionsmolekülexpression mittels US im direkten Anschluss an den Zelltransfer könnte zur Bildung inhomogener Untersuchungsgruppen führen. Dadurch könnten frühzeitige interindividuelle Unterschiede der Schwere der Erkrankung die Gesamtergebnisse verzerren. Um die unerwartete Expressionskinetik in der klinischen Remission genauer untersuchen zu können, wurde eine Stratifizierung zum Zeitpunkt des Erkrankungsmaximums vorgenommen, wodurch homogenere Untersuchungsgruppen entstanden, an denen die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 mit spezifischen MP untersucht werden konnte. Abbildung 9A gibt den Verlauf der Adhäsionsmolekülexpression nach dem klinischen Maximum wieder, Abbildung 9B setzt dazu wiederum den Verlauf der AT-EAE in Beziehung. Nach dem Erkrankungsmaximum (96h nach Zelltransfer) nehmen die klinischen Symptome der AT-EAE wieder ab. Im Gegensatz dazu ist die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 wie in den vorherigen Experimenten nicht rückläufig, sondern zeigt sogar einen leichten Anstieg in der frühen Remission (Pfeile). Daraufhin bleiben ICAM-1 und VCAM-1 aufreguliert und nähern sich in der späteren Remission langsam wieder dem Ausgangsniveau an.

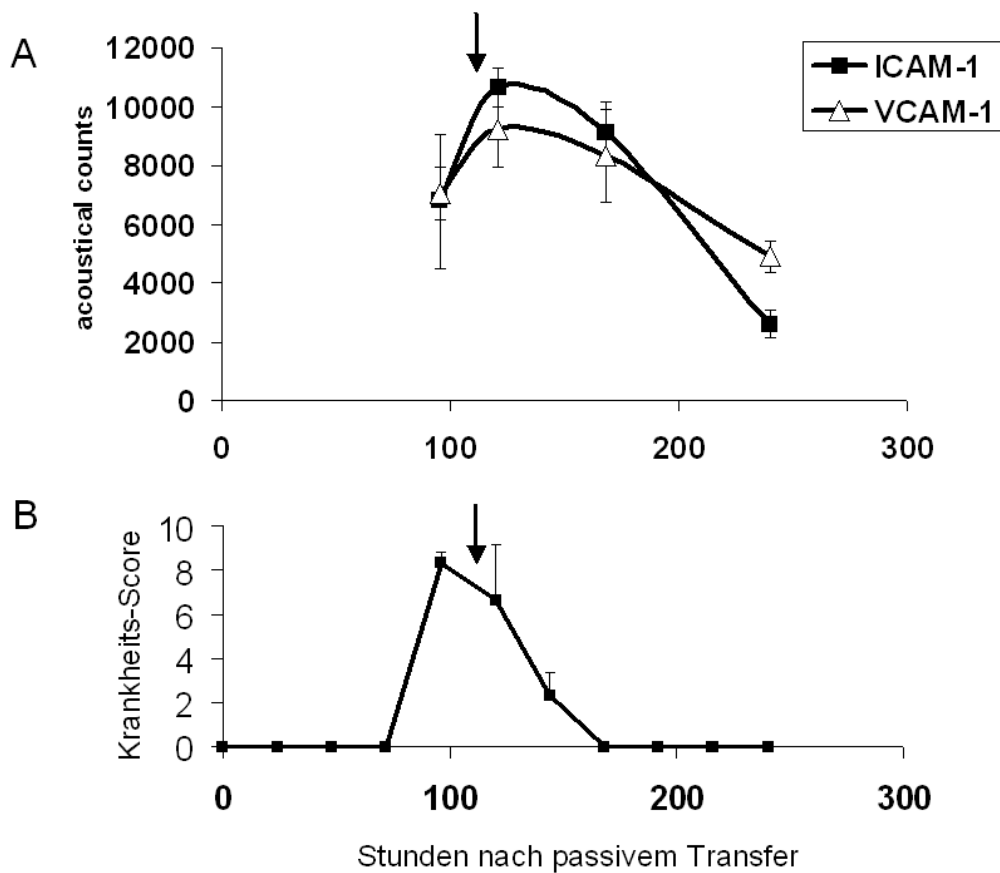


Abb. 9:
 Kontinuierliche Aufregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 bei AT-EAE nach dem Erkrankungsmaximum.
 Die Expression der Adhäsionsmoleküle wurde an den Tagen 4 (96h), 5 (120h), 7 (168h) und 10 (240h) nach Induktion der Erkrankung untersucht. Die gemessenen Werte für die Expression von ICAM-1 (schwarze Quadrate, n=3) und VCAM-1 (weiße Dreiecke, n=3) werden in acoustical counts angegeben (Abb. 9A). Abb. 9B setzt dazu unter Verwendung des EAN-Scores den Krankheitsverlauf der Tiere in Beziehung (n=6). In der frühen Remission der AT-EAE zeigt sich eine weitere Aufregulation von ICAM-1 und VCAM-1 (Pfeile). Die Expression der Adhäsionsmoleküle kehrt in der späten klinischen Remission verzögert auf ihre Ausgangswerte zurück.

3.3. Histologische Untersuchung der Expressionskinetik von ICAM-1 und VCAM-1 im Gehirn und Rückenmark der AT-EAE

Mit der sequentiellen molekularen Bildgebung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 konnte bei AT-EAE eine frühe Aufregulation von ICAM-1 und VCAM-1 gezeigt werden. Weiterhin konnte eine das klinische Maximum überdauernde Hochregulation beider Moleküle festgestellt werden.

Diese Expressionskinetik von ICAM-1 und VCAM-1 wurde qualitativ anhand histologischer Schnitte kontrolliert. Dazu wurden immunhistochemisch gefärbte Gefrierschnitte der periventriculären Region untersucht, die in der Ultraschalluntersuchung eine starke Kontrastmittelanreicherung gezeigt hat. Außerdem wurden als zusätzliche Kontrolle Verlaufsserien von Gefrierschnitten aus dem Rückenmark der AT-EAE-Tiere angefertigt.

Die Gewebe wurde innerhalb der wesentlichen Stadien der AT-EAE entnommen: Tag 2 (präsymptomatisches Stadium), Tag 4 (Maximum), Tag 5 (frühe Remission) und Tag 7 (späte Remission).

An Tag 2 (48 Stunden nach adoptivem Transfer, p.a.T.) findet sich eine schwache Expression von ICAM-1 (Abbildung 10) am Endothel zahlreicher kleiner Gefäße des Hirnparenchyms. Zum Krankheitsmaximum (d4, 96 Stunden p.a.T.) sind die Gefäße in vergleichbarer Anzahl stark positiv (dunkelbraun) gefärbt als Ausdruck einer deutlichen Aufregulation von ICAM-1. Ein identisches Bild bietet sich in der frühen Remission (d5, 120 Stunden). Die ICAM-1 Expression in der späten Remission (d7, 168 Stunden) ist im Vergleich zu Tag 5 rückläufig, liegt aber deutlich über der an Tag 2 gezeigten Expression. Somit bestätigt sich die in den Ultraschalluntersuchungen ermittelte Kinetik mit einem frühen Anstieg der ICAM-1 Expression, einer das Krankheitsmaximum überdauernden, starken Aufregulation und einem leicht verzögerten Rückgang in der Remission.

Die serielle histologische Untersuchung der VCAM-1-Expression (Abbildung 10) im Gehirn zeigt einen mit ICAM-1 vergleichbaren Verlauf. An Tag 2 (48 Stunden p.a.T.) sind einzelne größere Gefäße spezifisch gefärbt. An den Tagen 4 (96 Stunden) und 5 (120 Stunden) nimmt die Expression von VCAM-1 deutlich zu, es kommt zur

Anfärbung zahlreicher kleinerer parenchymatöser Gefäße. An Tag 7 (168 Stunden) nehmen sowohl die Anzahl VCAM-1-positiver Gefäße als auch die Stärke ihrer Anfärbung wieder ab. VCAM-1 ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den US-Untersuchungen schwächer exprimiert als ICAM-1.

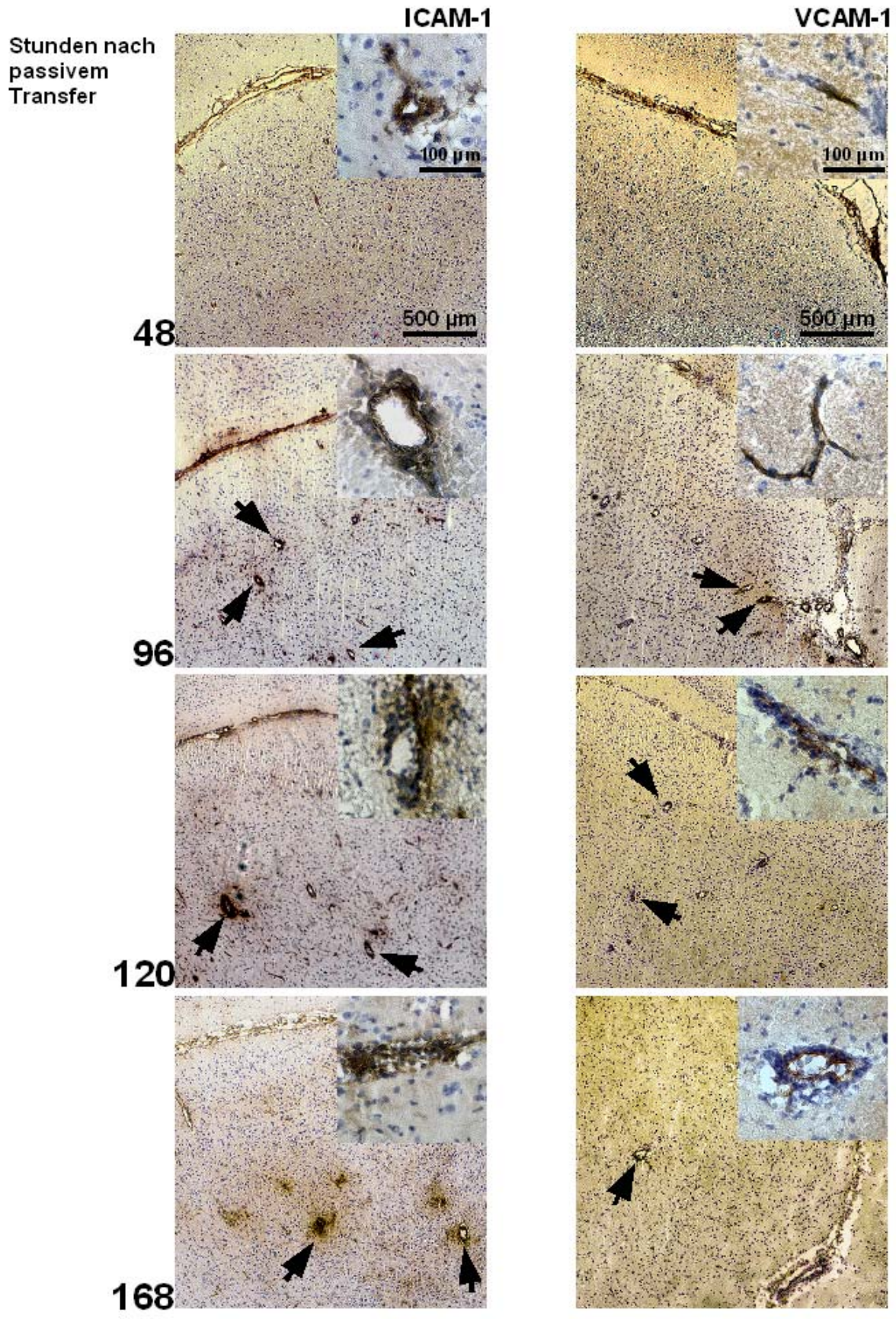


Abb. 10:

Immunhistochemische Untersuchung der Adhäsionsmolekülexpression an Gefrierschnitten des periventriculären Gehirns zu verschiedenen Zeitpunkten der AT-EAE. In der linken Spalte ist die ICAM-1-, in der rechten Spalte die VCAM-1-Expression 48 (präsymptomatisches Stadium), 96 (Progression), 120 (Krankheitsmaximum) und 168 Stunden (frühe Remission) nach adoptivem Transfer (p.a.T.) abgebildet. Die Ausschnitte sind mit 10facher Vergrößerung aufgenommen. Die eingefügten Detailaufnahmen (jeweils oben rechts) zeigen in 63facher Vergrößerung ICAM-1 bzw. VCAM-1 positive Gefäße. In den Detailaufnahmen ist die Anfärbung des Gefäßendothels, das die Adhäsionsmoleküle exprimiert, gut zu erkennen. Die Pfeile in den Übersichten deuten beispielhaft auf ICAM-1- bzw. VCAM-1-positive Gefäße. Nach 48 Stunden sind bereits einige kleine ICAM-1- bzw. VCAM-1-positive Gefäße erkennbar. Dies bestätigt die in den Ultraschalluntersuchungen gefundene frühe Aufregulation beider Adhäsionsmoleküle vor dem Einsetzen der Symptomatik. In der Phase der Krankheitsprogression (96 Stunden) und am Krankheitsmaximum (120 Stunden) ist sowohl für ICAM-1 als auch für VCAM-1 eine weitere, deutliche Aufregulation erkennbar. In der frühen Remission (168 Stunden) zeigt sich eine persistent hohe Expression beider Adhäsionsmoleküle über das Krankheitsmaximum hinaus und bestätigt somit wiederum die im US ermittelte Kinetik. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Ultraschalluntersuchungen ist VCAM-1 konstant schwächer exprimiert als ICAM-1.

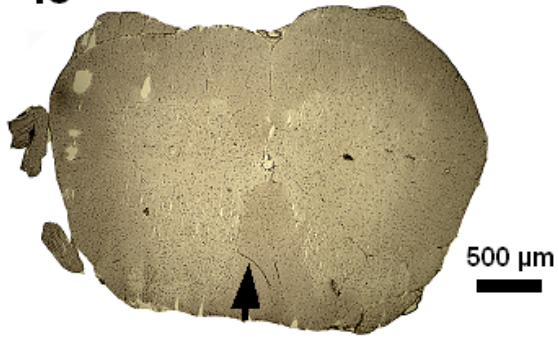
Auch die histologische Untersuchung des Rückenmarks bestätigt die sonographisch ermittelte Expressionkinetik der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1. Sowohl in der Übersicht als auch bei 10facher Vergrößerung in Abbildung 11 sind im lumbalen RM an Tag 2 (48 Stunden p.a.T.) einige ICAM-1-positive Gefäße sichtbar. An Tag 4 (96 Stunden) erreicht die Expression ihr Maximum und kehrt nur verzögert zum Ausgangsniveau zurück. Die immunhistochemische Färbung an Tag 7 (168 Stunden) ist im Vergleich zu Tag 2 deutlich stärker ausgeprägt.

Abbildung 12 zeigt den Verlauf der VCAM-1 Expression im lumbalen RM, die wiederum mit den Ergebnissen der ICAM-1 Färbungen des Rückenmarks vergleichbar sind.

Somit wird die mit der molekularen Bildgebung gemessene Expressionskinetik der Adhäsionsmoleküle immunhistochemisch in verschiedenen Arealen des ZNS bestätigt.

Stunden nach
passivem
Transfer

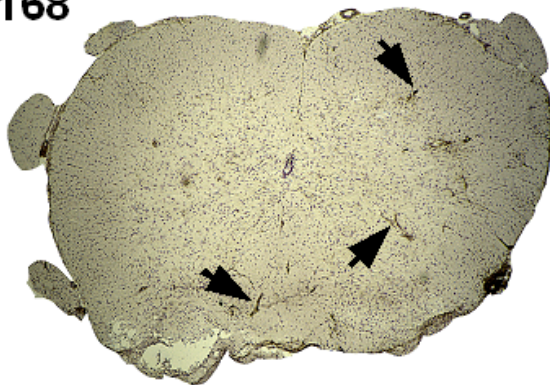
48



96



168



ICAM-1

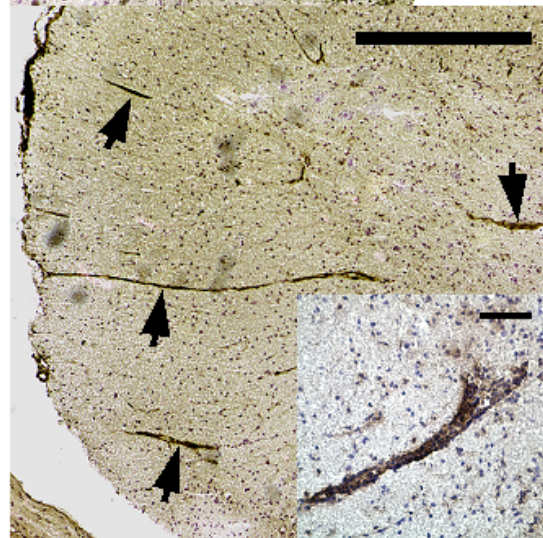
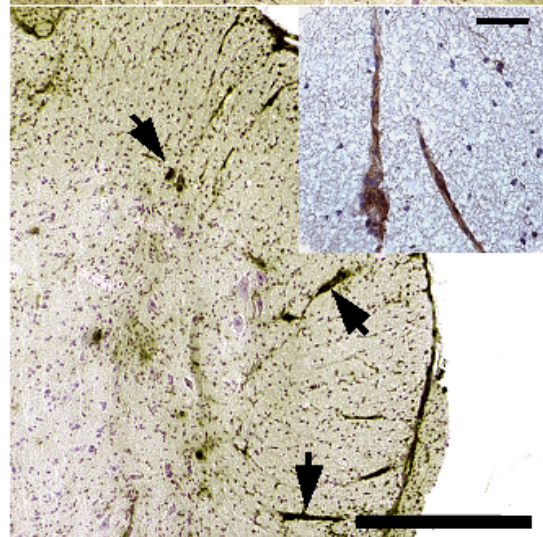
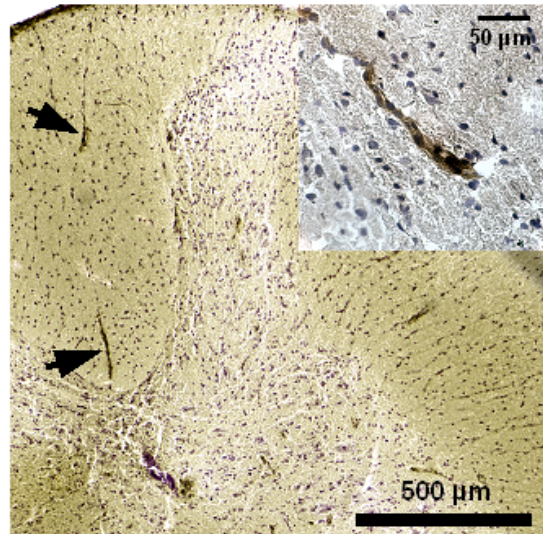


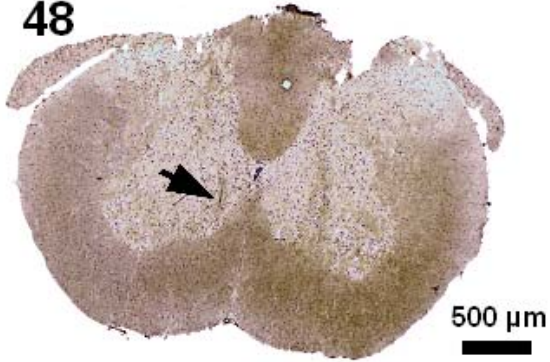
Abb. 11:

Immunhistochemische Untersuchung der Expression von ICAM-1 an Gefrierschnitten des lumbalen Rückenmarks 48 (Progression), 96 (Maximum) und 168 Stunden (Remission) nach Krankheitsinduktion. In der linken Spalte sind Übersichtsaufnahmen in 2,5facher, in der rechten Spalte in 10facher Vergrößerung abgebildet. Die eingefügte Detailaufnahme (rechts oben) zeigt ICAM-1 positive Gefäße im lumbalen Rückenmark in 63facher Vergrößerung. Die Pfeile in den Übersichtsaufnahmen markieren jeweils ICAM-1 positive Gefäße. Wie schon an den Gehirnschnitten gezeigt findet sich bereits vor Einsetzen klinischer Symptome (48 Stunden p.a.T.) einige ICAM-1 positive Gefäße im lumbalen Rückenmark. Zum klinischen Maximum (96h p.a.T.) kommt es zu einer deutlichen, starken Aufregulation von ICAM-1, erkennbar an der Vielzahl stark angefarbter Gefäße, die auch in der Remission (168h p.a.T.) noch gut zu erkennen ist.

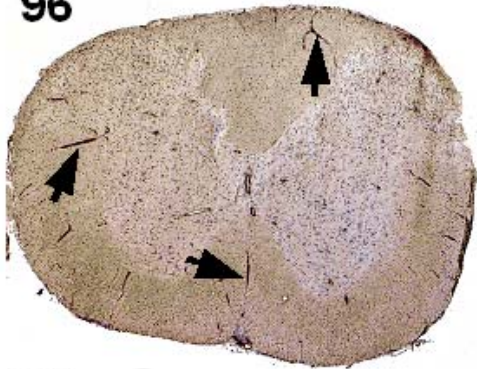
VCAM-1

Stunden nach
passivem
Transfer

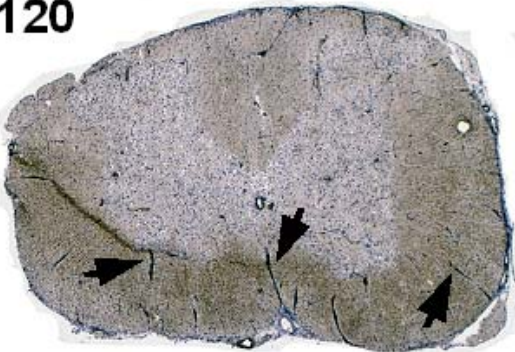
48



96



120



168

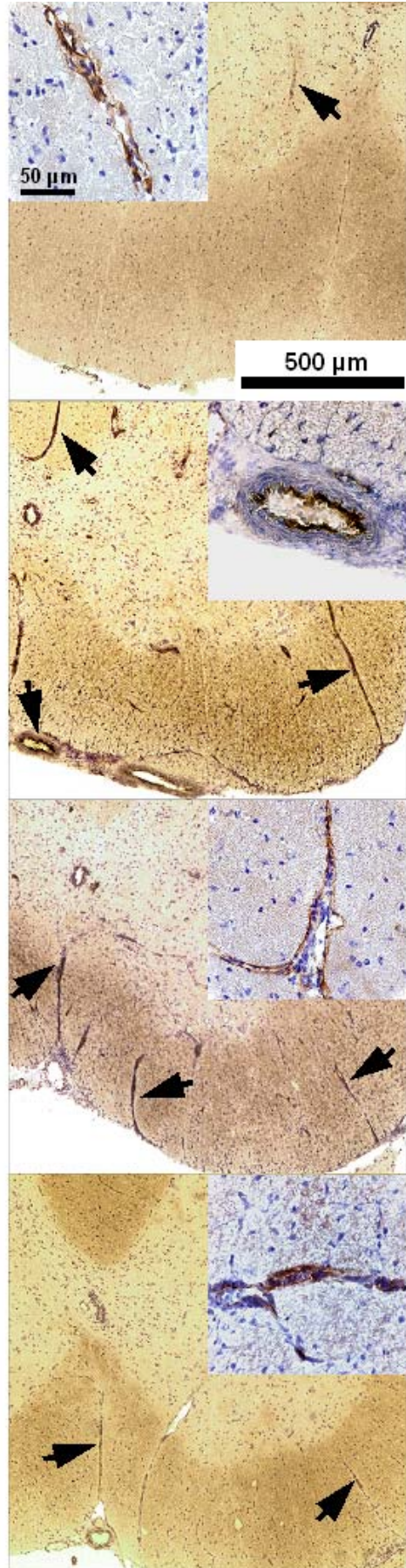
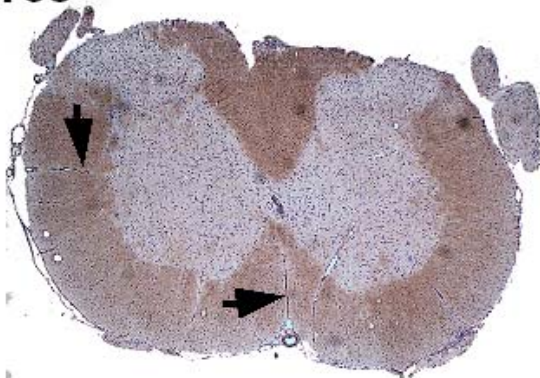


Abb. 12: Immunhistochemische Untersuchung der VCAM-1 Expression an Gefrierschnitten des lumbalen Rückenmarks 48 (Progression), 96 (Maximum), 120 (frühe Remission) und 168 Stunden (späte Remission) nach Krankheitsinduktion. In der linken Spalte sind Übersichtsaufnahmen in 2,5facher, in der rechten Spalte in 10facher Vergrößerung abgebildet. Die eingefügte Detailaufnahme (rechts oben) zeigt ein VCAM-1 positives Gefäß in 63facher Vergrößerung. Die Pfeile in den Übersichtsaufnahmen markieren jeweils VCAM-1 positive Gefäße. Die VCAM-1 Expression entspricht in ihrer zeitlichen Dynamik der in Abb. 12 gezeigten Kinetik der ICAM-1 Expression im lumbalen Rückenmark. VCAM-1 ist auch im Rückenmark schwächer exprimiert als ICAM-1. Das frühe Auftreten einzelner VCAM-1 positiver Gefäße in der Krankheitsprogression (48h p.a.T.) ist gefolgt von einer deutlichen Aufregulation der Expression am Krankheitsmaximum (96h p.a.T.) sowie in der frühen Remission (120h p.a.T.). Erst in der späteren Remission (196h p.a.T) nimmt die Anzahl und Stärke VCAM-1 positiver Gefäße wieder ab.

3.4. Histopathologische Quantifizierung der entzündlichen Aktivität

Ziel der folgenden Experimente war es, die Expressionkinetik der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 in Beziehung zu der Zusammensetzung zellulärer entzündlicher Infiltrate in den verschiedenen Phasen der AT-EAE zu setzen. Dafür wurde primär die Anzahl CD4- und CD8-positiver Zellen an 4 verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung bestimmt. Die Zellzahlen wurden aus Gründen der besseren Quantifizierbarkeit an entsprechend gefärbten Rückenmarksschnitten bestimmt.

Abbildung 13 zeigt den quantitativen Verlauf der Entzündungsreaktion im Rückenmark an den Tagen 2 (präklinisches Stadium), 4 (Maximum), 6 (frühe) und 7 (späte Remission).

Die CD8-positiven Profile sind quantitativ stärker vertreten als die CD4-positiven. Beide Populationen zeigen zunächst erwartungsgemäß einen Anstieg bis zum Krankheitsmaximum. Daraufhin folgt jedoch nicht wie erwartet eine Abnahme der Zellzahlen parallel zum klinischen Verlauf, sondern es kommt zu einer Zunahme bzw. Persistenz beider Zellpopulationen in der frühen Remission sowie einer verzögerten Abnahme bis zur späten Remission. Dieser Verlauf entspricht damit weitestgehend dem der Adhäsionsmolekülexpression in US und Histologie im Sinne einer das Krankheitsmaximum überdauernden und bis in die späte Remission hineinreichenden Präsenz von Entzündungszellen.

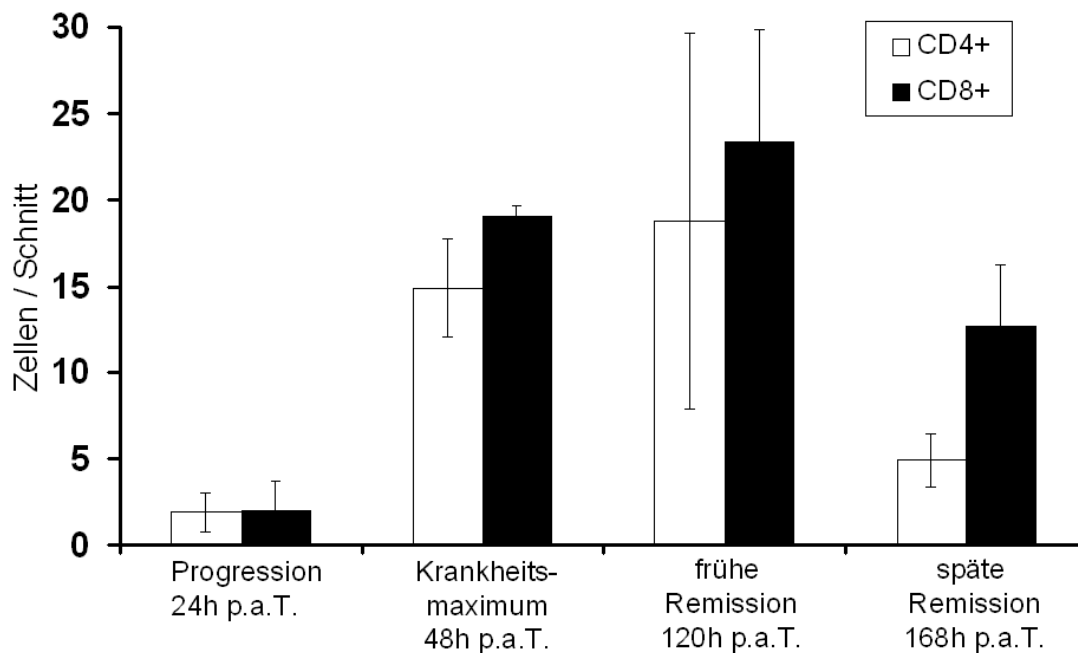


Abb. 13:

Quantifizierung von T-Zell-Subpopulationen an immunhistochemisch gefärbten Querschnitten des Rückenmarks in verschiedenen Stadien der AT-EAE. Die Balken geben die durchschnittliche Anzahl CD4-positiver Zellen (weiß) und CD8-positiver Zellen (schwarz) je Rückenmarksschnitt in der Krankheitsprogression (d2, 48h p.a.T.), am Krankheitsmaximum (d4, 96h p.a.T.) sowie in der frühen (d5, 120h p.a.T.) und späten Remission (d7, 168h p.a.T.) wieder. Die Auszählung erfolgte an zervikalen, thorakalen und lumbalen, immunhistochemisch gegen CD4 und CD8 gefärbten Rückenmarksschnitten. 5 Schnitte aus den verschiedenen Rückenmarksabschnitten von je 3 Tieren wurden zu jedem Zeitpunkt untersucht. Ausgehend vom Zeitpunkt der Krankheitsprogression, an dem nur wenige Entzündungszellen im Rückenmark gefunden werden, steigt ihre Anzahl zum Krankheitsmaximum hin erwartungsgemäß stark an auf Werte zwischen 15 und 20 Zellen/Schnitt, wobei die Anzahl CD8-positiver Zellen wie im gesamten weiteren Verlauf leicht überwiegt. Entgegen der Erwartung, dass die Anzahl der Entzündungszellen zum Krankheitsmaximum ihren höchsten Wert erreicht, um in der Folge wieder abzunehmen, persistiert die Anzahl sowohl CD4- als auch CD8-positiver Zellen in der frühen Remission bzw. zeigt sogar einen leichten Anstieg. Beide Subpopulationen zeigen einen Abfall in der späten Remission, zu einem Zeitpunkt, an dem die Tiere in der Regel keine Symptome mehr zeigen.

3.5. FACS-Analyse von Subpopulationen des zellulären Infiltrates im ZNS

Angesichts der oben aufgeführten Ergebnisse der CD4- und CD8-Quantifizierung stellte sich die Frage nach einer genaueren Zusammensetzung der Entzündungsinfiltrate, insbesondere im Hinblick auf regulatorische Subpopulationen von T-Lymphozyten. Dafür erfolgte die durchflusszytometrische Analyse des ZNS. An den Tagen 3 (Prämaximum), 4 (Maximum) und 5 (frühe Remission) wurden die Gehirne und das Rückenmark von jeweils 3-4 Tieren gepoolt und gemeinsam homogenisiert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, CD25, CD28 und FoxP3 gefärbt. Als Positivkontrolle für die Färbungen und als Quantifizierungsvergleiche dienten Splenozyten aus den gepoolten Milzen der Tiere.

Die Quantifizierung der Gesamtlymphozytenzahl (CD3+), der aktivierten T-Helferzellen (CD4+, CD25+) sowie der T-Suppressorzellen (CD8+, CD28-) ergab jeweils einen dem Krankheitsverlauf der AT-EAE folgenden, d.h. zu diesem annähernd parallelen Verlauf. Allerdings zeigten CD4+ positive und CD8+ positive Lymphozyten eine zahlenmäßige Persistenz in der Phase der frühen Remission, vergleichbar mit den Ergebnissen der histologischen Untersuchungen.

Abbildung 14 gibt die Anteile der CD4- und CD8-positiven Zellen an der Gesamtzahl der Zellen im primären Lymphozytengate im Verlauf der AT-EAE wieder.

Erwartungsgemäß findet ein Anstieg beider Zellpopulationen vom Stadium der Krankheitsprogression zum Krankheitsmaximum hin statt. Sowohl die Zahl CD4-positiver als auch die Zahl CD8-positiver Zellen nimmt jedoch in der Phase der frühen Remission nur geringfügig ab. Entgegen der Erwartung, dass mit dem raschen Rückgang der Klinik auch das entzündliche Infiltrat abnimmt, ist in der frühen Remission eine hohe Anzahl beider Zellpopulationen im ZNS anzutreffen.

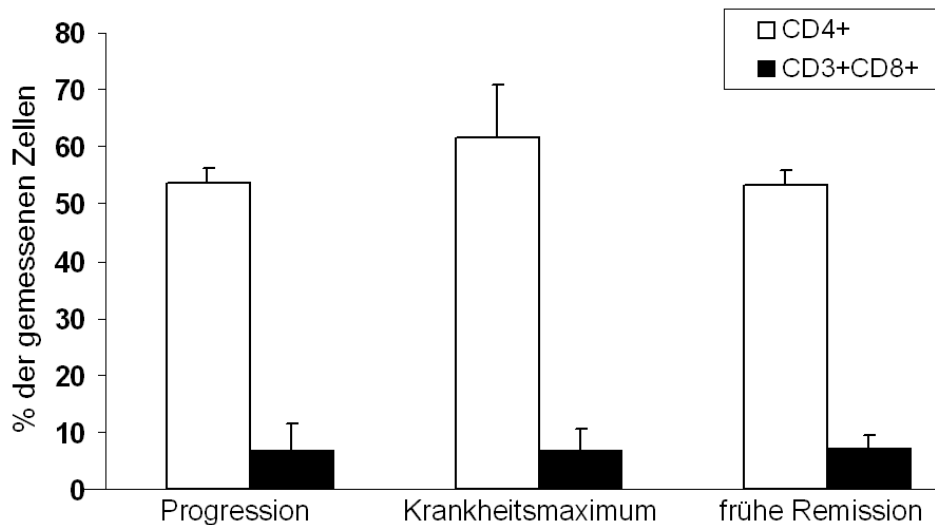


Abb. 14:
 Quantifizierung CD4- sowie CD3- und CD8- positiver T-Lymphozyten bei der AT-EAE mittels Durchflusszytometrie des ZNS in der Progressionsphase, am Krankheitsmaximum und in der frühen Remission. Die Balken repräsentieren den Anteil CD4-positiver T-Zellen (schwarz) sowie CD3- und CD8-positiver T-Zellen (weiß) an der Lymphozytenpopulation im ZNS. Die CD4-positiven Lymphozyten zeigen einen leichten Anstieg zum Krankheitsmaximum hin auf über 60% der gemessenen Zellen. Die Population fällt in der frühen Remission zwar leicht ab auf Werte von etwa 50% der gemessenen Zellen, dennoch befinden sich in dieser Krankheitsphase unerwartet viele Zellen im ZNS. Die Anzahl CD3- und CD8-positiver Lymphozyten zeigt in dieser Untersuchung ein konstantes Niveau im Bereich von etwa 7,5% der gemessenen Zellen zu allen 3 Messzeitpunkten.

Als nächster Typisierungsschritt wurde die für die Remission bedeutsame T-Zell-Population der CD4-, CD25-, FoxP3-positiven regulatorische T-Zellen in der Durchflusszytometrie quantifiziert.

Abbildung 15 zeigt die Anteile regulatorischer T-Zellen an der Lymphozytenpopulation in einer Splenozytenkontrolle und in der aus dem ZNS gewonnenen Lymphozytenpopulation.

Die regulatorisch aktiven T-Lymphozyten im ZNS zeigen eine deutliche Zunahme dieser Subklasse von nicht messbaren Werten an Tag 3 über 0,35 % der gemessenen Zellen am Krankheitsmaximum bis auf 0,95 % der gemessenen Zellen in der frühen Remission. Die aus der Milz gefundenen Anteile an regulatorischen T-Zellen entsprechen den in der Literatur gefundenen Werten und dienen als Positivkontrolle.

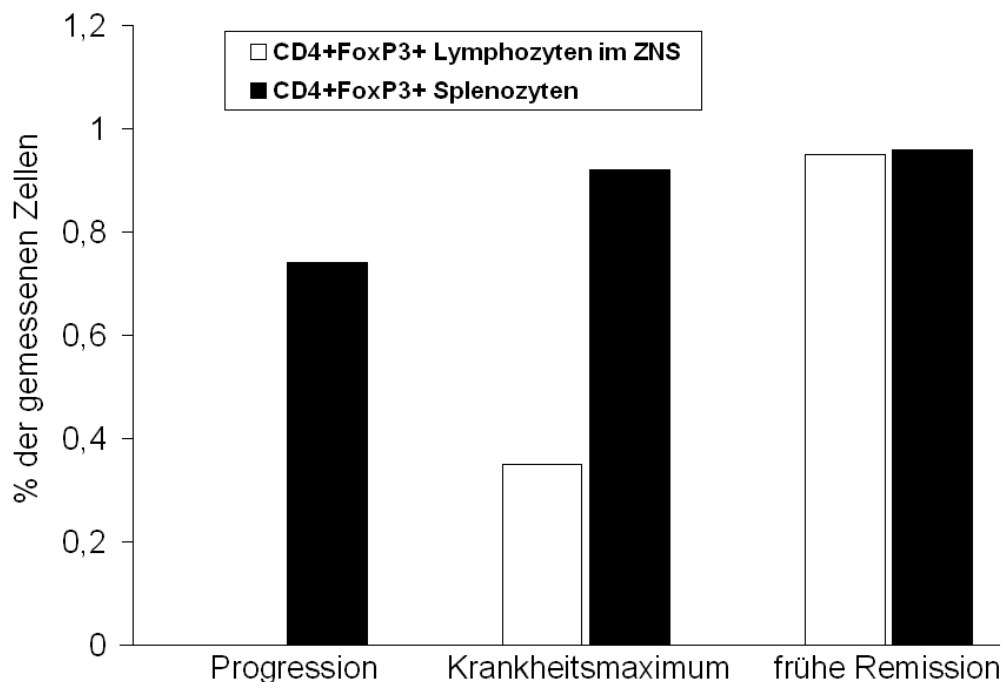


Abb. 15:

Durchflusszytometrische Quantifizierung der CD4- und FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen (Tregs) in Milz und ZNS zu verschiedenen Zeitpunkten der AT-EAE (repräsentatives Experiment, Resultate reproduziert). Die Balken geben die Anteile der regulatorischen T-Zellen an den Splenozyten (schwarz; 1×10^4 Zellen/Messung) und an der Lymphozytenpopulation im ZNS (weiß; je nach Zellausbeute $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ Zellen/Messung) wieder. In der Krankheitsprogression sind etwa 0,75% der Splenozyten Tregs, während diese Population im ZNS in der Progressionsphase überhaupt nicht messbar ist. Die regulatorischen T-Zellen im ZNS steigen zum Krankheitsmaximum und noch stärker in der frühen Remission auf etwa 1% der Lymphozyten im ZNS deutlich an. Die als Positivkontrolle dienenden regulatorischen T-Zellen in der Milz zeigen einen leichten Zuwachs zum Krankheitsmaximum hin, um im weiteren Verlauf bis zum Zeitpunkt der frühen Remission in etwa konstant zu bleiben.

3.6. Blockade von ICAM-1 in vivo bei AT-EAE mit monoklonalen Antikörpern

Die Interaktion mit ICAM-1 ist eine wichtige Voraussetzung für die Migration enzephalithogener Lymphozyten ins ZNS. Die Ergebnisse der sequentiellen US-Untersuchungen wie auch die Immunhistochemie von Gehirn und Rückenmark haben eine persistierend hohe Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in der frühen Remission gezeigt. Die durchflusszytometrische Quantifizierung der Entzündungszellen im ZNS ergab einen trendmäßigen Anstieg regulatorischer T-Zellen in der frühen Remission der AT-EAE. In der Zusammenschau lassen diese Daten die Vermutung zu, dass Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 auch an der Einwanderung regulatorischer Zellen in das ZNS beteiligt sein könnten. Um die mögliche Bedeutung der hohen Adhäsionsmolekülexpression in der frühen Remission zu untersuchen, wurde ICAM-1 zu verschiedenen Zeitpunkten der AT-EAE mittels eines monoklonalen Antikörpers blockiert. Falls Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 an der Transmigration unterschiedlicher, u.a. auch regulatorischer Populationen von Entzündungszellen über die BHS beteiligt sind, sollte die Blockade in verschiedenen Phasen der Erkrankung zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Durch Injektion von 7 Mio T-Zell-Blasten je Tier wurde in 2 Versuchsgruppen mit je 10 weiblichen Lewis-Ratten eine MBP-AT-EAE (maximaler EAE-Score 6-7) induziert. Ab dem dritten Tag nach Induktion wurden die Tiere in mehrstündigen Intervallen regelmäßig klinisch nach dem EAE-Score bewertet.

80 Stunden nach dem Zelltransfer, in der Phase der Krankheitsprogression wurden aus der ersten Versuchsgruppe (n=10) je 3 Tiere einer Verum- und einer Placebogruppe zugeordnet. Es wurde dabei auf eine homogene, für die Krankheitsphase repräsentative Verteilung der Score-Werte innerhalb beider Gruppen und der Gruppen untereinander geachtet. Die übrigen 4 Tiere bildeten eine Kontrollgruppe. Analog wurden je 3 Tiere der zweiten Versuchsgruppe (n=10) nach etwa 100 Stunden, im Stadium der frühen Remission nach Überschreiten des klinischen Maximum einer Verum- und eine Placebogruppe zugeteilt.

Je drei Tuberkulinspritzen wurden entweder mit je 1ml anti-ICAM-1-Antikörper 1A29 (entsprechend 1mg) in endotoxinreduzierter und natriumazidfreier Darreichung

(NA/LE) oder je 1ml PBS aufgezoogen und anschließend von einem Mitarbeiter des Labors randomisiert. Auf diese Weise konnte die Bewertung der Krankheitsschwere der Tiere geblindet vorgenommen werden. Unter Äthernarkose wurde jedem der 6 ausgewählten Tiere 1000µl entsprechend 1mg anti-ICAM-1-AK verdünnt in PBS bzw. nur PBS mittels einer 25G-Kanüle in eine Schwanzvene injiziert. Im weiteren Verlauf bis zur späten Remission wurden die Tiere in mehrstündigen Abständen klinisch bewertet.

Abb. 16A und 16B geben die klinischen Verläufe der AT-EAE vor und nach interventioneller Blockade von ICAM-1 mit dem monoklonalen Antikörper 1A29 80 bzw. 100 Stunden nach dem Zelltransfer wieder. Zunächst wird deutlich, dass die behandelten Tiere vor der Injektion in beiden Experimenten einen gleichförmigen Verlauf zeigen.

Bei einer Intervention 80h nach Induktion der AT-EAE (Abb 16A, Pfeil) zum Zeitpunkt der Krankheitsprogression zeigt die Verumgruppe eine signifikante, kurze Verbesserung der Symptomatik im Vergleich zur Placebogruppe und zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dieser Effekt könnte auf der verminderten Einwanderung enzephalithogener T-Zellen in das ZNS beruhen, da diese mit ICAM-1 interagieren müssen, bevor sie die BHS passieren können. Etwa 100 Stunden nach dem Zelltransfer kommt es zu einem leichten Einknicken der Krankheitskurve. Da dieser Knick ebenfalls in den beiden Kontrollgruppen zu erkennen ist, kann ausgeschlossen werden, dass er auf die Antikörperbehandlung zurückzuführen ist.

In einem zweiten Blockadeexperiment (Abb. 16B) wurde der Antikörper in der Phase der frühen Remission etwa 100h nach dem Zelltransfer injiziert (Pfeil). Eine Blockade von ICAM-1 in diesem Stadium führt zu einer signifikanten, wiederum nur kurz anhaltenden Verschlechterung der klinischen Symptomatik im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Dies könnte die Folge des behinderten Eintrittes regulatorischer bzw. antiinflammatorischer Elemente in das ZNS vermittelt durch ICAM-1 sein.

Im weiteren Verlauf der Erkrankung nähern sich die Verum- und die Kontrollgruppen in beiden Experimenten wieder einander an, so dass in der späteren Remission keine Unterschiede mehr in der Klinik erkennbar sind.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die Effekte nach Intervention mit monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 bei der AT-EAE entscheidend vom Zeitpunkt der Antikörpergabe abhängig sind. Während die Injektion in der Progressionsphase der Erkrankung die volle Ausprägung der EAE verhindern kann, führt die Intervention in der frühen Remission zu einer klinischen Verschlechterung.

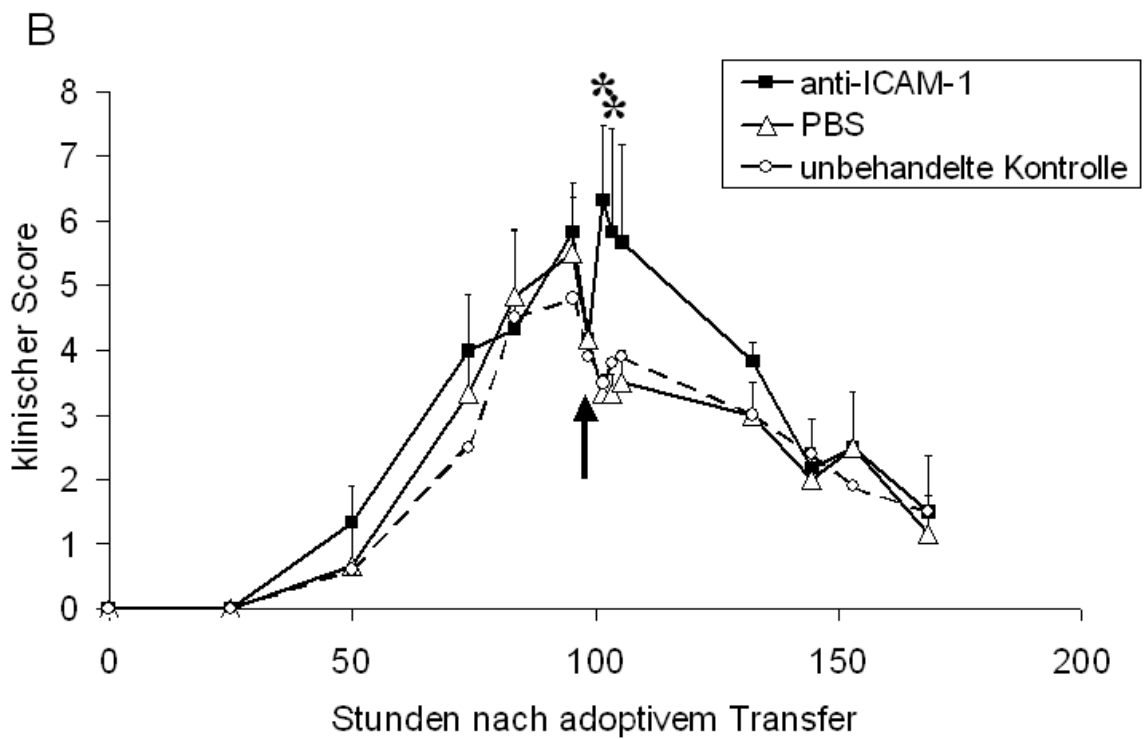
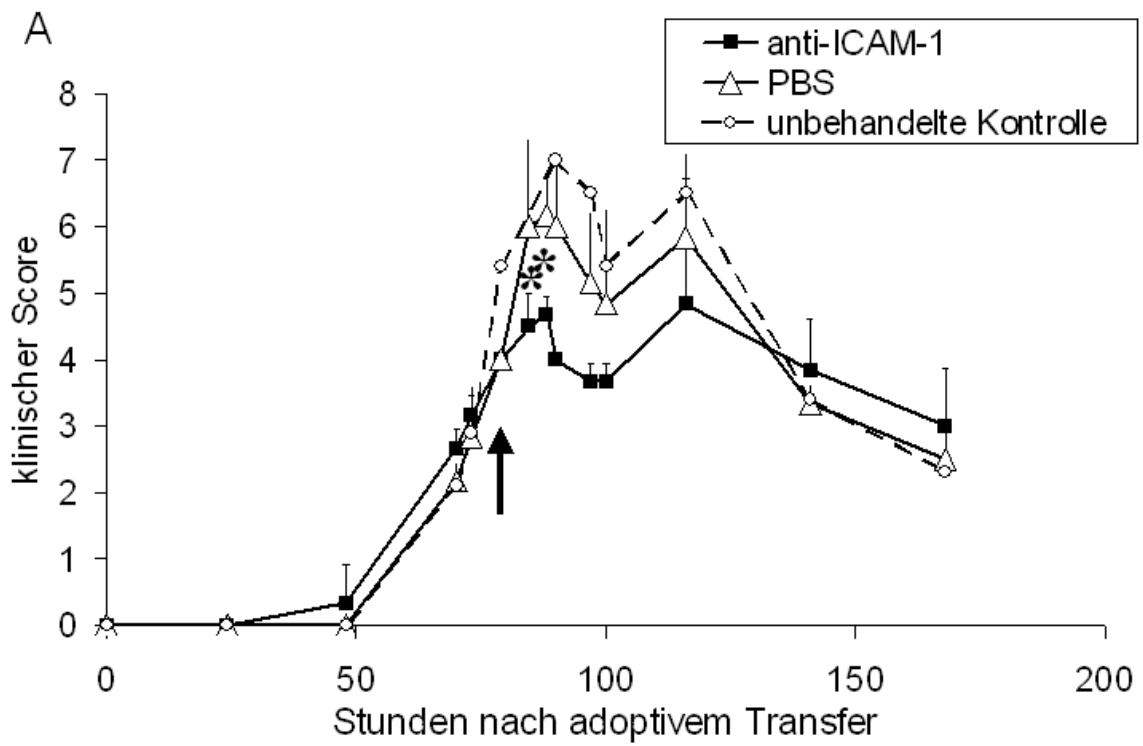


Abb.16:

Blockade von ICAM-1-Molekülen an der BHS durch Intervention mit dem monoklonalen anti-ICAM-1 Antikörper 1A29 in der Krankheitsprogression (Abb.17A, etwa 80 Stunden nach Krankheitsinduktion) bzw. in der beginnenden Remission (Abb. 17B, etwa 100 Stunden nach Krankheitsinduktion) der AT-EAE. Die antikörperbehandelten Tiere (n=3) sind als schwarze Quadrate, die PBS-behandelten Kontrolltiere (n=3) als weiße Dreiecke und die unbehandelte Kontrollgruppe (n=4) als weiße Kreise dargestellt. Die Tiere wurden nach dem EAN-Score bewertet. Die Zeitpunkte der i.v.-Injektion des AK sind mit Pfeilen markiert. Während die Gabe des AK in der Krankheitsprogression zu einer signifikanten, kurzen Abmilderung der Symptomatik im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen führt (Abb.17A) verursacht der AK, gegeben in der beginnenden Remission, eine kurzdauernde klinische Verschlechterung (Abb. 17B). Dies legt nahe, dass der Zeitpunkt der Intervention entscheidend für den Effekt des AK auf den Verlauf der AT-EAE ist. Im Folgenden nähern sich die Kurven der AK-behandelten und der Kontrolltiere einander an und zeigen einen vergleichbaren Verlauf. Der Knick in der Krankheitskurve in Abb. 17A (etwa 100 Stunden nach adoptivem Transfer) findet sich in allen 3 Gruppen, so dass hier ein Effekt durch den AK ausgeschlossen werden kann. * Der Krankheitscore der AK-behandelten Gruppe ist signifikant niedriger bzw. höher als der Scorewert der Kontrollgruppe ($p < 0,05$)

4. Diskussion

4.1. Diskussion zur Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist bei allen entzündlichen Erkrankungen des ZNS, so auch bei der Multiplen Sklerose und der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) über die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen aktiv und entscheidend an der Einwanderung entzündlicher Zellen in das ZNS bzw. deren Regulation beteiligt (Engelhardt, 2006). Daher sind Erkenntnisse über die für Zelladhäsion und Zelltransmigration wesentlichen molekularen Vorgänge an der BHS nicht nur für das bessere Verständnis der Pathogenese entzündlicher ZNS-Erkrankungen von Bedeutung, sondern erhellen darüber hinaus wichtige Aspekte für die therapeutische Intervention an der BHS.

Wie aus Arbeiten der letzten 10 Jahre deutlich wird, interagieren aktivierte T-Zellen auf besondere Weise mit der BHS. Unter Verwendung der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die initiale Abbremsung und die darauffolgende feste Adhäsion aktivierter T-Zellen am Endothel des Gehirns über die Interaktion von VLA-4 mit dem am Endothel exprimierten Adhäsionsmolekül VCAM-1 vermittelt wird (Vajkoczy et al., 2001) und dass die Interaktion von LFA-1 und ICAM-1 für die Transmigration dieser Zellen in das ZNS wesentlich ist (Laschinger et al., 2002). Obwohl diese Interaktionen zwischen T-Zelle und BHS aufgeklärt wurden, war bisher nur wenig über den zeitlichen Verlauf der Expression solcher Adhäsionsmoleküle während des klinischen Verlaufes der AT-EAE bekannt.

Die hier angewandte ultraschall-basierte SPAQ-Methode ermöglichte es, die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 im zeitlichen Verlauf zu untersuchen und zu quantifizieren. Wie erwartet, verläuft der Anstieg der Expression der Adhäsionsmoleküle parallel zum Krankheitsverlauf. Interessanterweise findet sich eine Aufregulation von ICAM-1 und VCAM-1 bereits vor dem Auftreten erster Krankheits-Symptome. Entgegen der Erwartung, die Adhäsionsmoleküle würden mit dem Rückgang klinischer Zeichen der EAE ebenfalls vermindert exprimiert, zeigte sich ein weiterer Anstieg der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in der Phase der frühen Remission und eine nur langsame

Rückkehr der Expression auf ihre Ausgangswerte. Die quantitative Untersuchung des zellulären Infiltrates im Verlauf der AT-EAE ergab eine unerwartet hohe Anzahl CD4-positiver Zellen im ZNS im Stadium der frühen Remission. Insbesondere CD4- und FoxP3- positive regulatorische T-Zellen zeigten einen messbaren Anstieg in dieser Krankheitsphase. Obwohl insgesamt recht kleine Werte von maximal 0,95% der gewerteten Zellen im Vergleich zu den Anteilen anderer Subklassen von T-Zellen an der Gesamtheit gemessen wurden, kann der Anstieg der regulatorischen T-Zellen im Verlauf der AT-EAE dennoch als eindeutiger Trend gewertet werden.

Regulatorische T-Zellen sind in der Lage, auch in geringer Anzahl durch direkte oder indirekte Effekte auf antigen-präsentierende Zellen die Aktivierung und Differenzierung pathogener T-Lymphozyten zu beeinflussen (Bluestone und Tang, 2005). Obwohl der direkte experimentelle Beweis noch aussteht, ist es wahrscheinlich, dass auch die Einwanderung regulatorischer T-Zellen in das ZNS über eine Interaktion von VCAM-1 und VLA-4 bzw. ICAM-1 und LFA-1 vermittelt wird, dass also kein grundsätzlicher Unterschied zwischen der molekularen Interaktion proinflammatorischer und regulatorischer Zellen mit und an der BHS besteht. Die Interaktionen zwischen unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen und der BHS könnten aber je nach ihrer Zusammensetzung und Funktion zu verschiedenen Zeitpunkten während des Krankheitsverlaufes der EAE von unterschiedlicher Bedeutung sein.

Diese Annahme konnte durch die Gabe hoher Dosen des monoklonalen Antikörpers 1A29 gegen ICAM-1 zu verschiedenen Krankheitszeitpunkten bestätigt werden. Während die Intervention mit diesem Antikörper in der Progressionsphase der Erkrankung die Symptomatik signifikant verbesserte, war die Gabe des Antikörpers in der frühen Remission von einer klinischen Verschlechterung der behandelten Tiere gefolgt. Zumindest teilweise verantwortlich für diese kurze Zunahme der Symptome könnte zum Teil die blockierte Einwanderung regulatorischer T-Zellen in das ZNS sein. Die völlig gegensätzlichen Verläufe nach Antikörperbehandlung, die nur durch den Zeitpunkt der Behandlung determiniert werden, zeigen auch, dass es sich hierbei nicht um unspezifische Effekte des Antikörpers handeln kann.

Enschränkend ist festzustellen, dass es sich nur um einen sehr kurzfristigen Effekt handelt, der mit der Intervention durch den anti-ICAM-AK erzielt wird. Das mag zum einen mit der Tatsache zusammenhängen, dass ICAM-1 ein ubiquitär im Organismus

vorkommendes Molekül ist und bei einer EAE an der BHS stark vermehrt exprimiert wird (Lee and Benveniste, 1999). Somit könnten die verwendeten, hohen Antikörperdosen immer noch zu gering gewesen sein um einen längerdauernden Effekt zu erzielen. Weiterhin ist es möglich, dass es zu einer kompensatorischen Gegenregulation in Form einer Überexpression von ICAM-1 an der BHS kommt. Anhand dieser Beobachtungen liegt es nahe anzunehmen, dass der Zeitpunkt einer therapeutischen Intervention an der BHS für die Ausprägung der Erkrankung bestimmend ist. Sie legen ferner den Schluß nahe, dass die Blockade eines einzelnen Zelladhäsionsmoleküls Einfluß auf ein komplexeres regulatorisches Netzwerk nimmt und somit keine einfache Beziehung zwischen Antikörper-Liganden Bindung und globalem immunpathologischem Effekt herzustellen ist. Diese Hypothese könnte eine Erklärung bieten für die widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur bezüglich einer Therapie der EAE mit anti-ICAM Antikörpern. Während einige Studien einen Therapieeffekt zeigen konnten (Archelos et al., 1993; Morrissey et al., 1996), konnte dieser Effekt von anderen nicht reproduziert werden oder die Behandlung führte eher zu einer klinischen Verschlechterung der Erkrankung (Rose et al., 1999; Willenborg et al., 1993). Die meisten der positiven Behandlungserfolge wurden nach kontinuierlicher Gabe des Antikörpers direkt nach dem Zelltransfer beobachtet, was zu einer generellen Blockade der T-Zell Migration führt, wohingegen Interventionsexperimente keinen oder sogar einen negativen Effekt auf den klinischen Verlauf im Vergleich zu placebo-behandelten Tieren hatten.

In diesem Zusammenhang sind klinische Studien in akuten MS-Schüben mit Natalizumab (Tysabri™), einem humanisierten anti-VLA-4 Antikörper, der die Bindung dieses Moleküls an VCAM-1 und damit die Leukozytenadhäsion an die BHS verhindert, von großer Bedeutung (O'Connor et al., 2004). Obwohl Natalizumab als immunmodulatorisches Medikament zur Schubprävention und Verlangsamung der Krankheitsprogression der MS äußerst erfolgreich war, wie es in der kürzlich veröffentlichten AFFIRM-Phase-III-Studie gezeigt wurde (Polman et al., 2006), hatte der Antikörper weder einen Effekt als interventionelle Therapie während eines akuten MS-Schubes noch konnte er die Erholung nach einem Schub beschleunigen (O'Connor et al., 2004). In dieser doppelblinden, multizentrischen Studie erhielten 180 Patienten mit akutem MS-Schub einmalig entweder Natalizumab i.v (n=60) oder ein Placebo

(n=63). Die Effekte der Intervention im Sinne einer klinischen Verbesserung nach dem Schub bzw. der Veränderungen im EDSS-Score (Expanded Disability Status Scale) sowie Zahl und Volumen gadolinium-anreichernder Herde wurden über 14 Wochen nach Intervention verfolgt. Obwohl in den Natalizumab-Gruppen eine signifikante Reduktion der Volumenzunahme gadolinium-anreichernder Herde im ZNS um über 60% im Vergleich zur Placebogruppe und eine leichte Abnahme der ihrer Anzahl beobachtet werden konnte, konnte keine beschleunigte Erholung nach dem Schub in der Natalizumab-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe gezeigt werden.

Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse dieser Studie wird vielmehr deutlich, dass die klinische Erholung der Placebogruppe innerhalb der ersten Woche nach dem Schub im Vergleich zu der der behandelten Gruppe sogar rascher und deutlicher erscheint, auch wenn diese Unterschiede im EDSS-Score am Ende der Studie nicht mehr zu erkennen sind. So liegt die mittlere Änderung im EDSS-Score der Natalizumab-Gruppe in den ersten 4 Wochen nach Intervention konstant unter derjenigen der Placebogruppe und nähert sich erst in der zweiten Hälfte der Beobachtungszeit an die Werte der Placebogruppe an. Ausserdem wies die behandelte Gruppe eine höhere Rate an Schüben während der Laufzeit der Studie auf, die mit Kortikosteroiden behandelt werden mussten. Obwohl weder die Unterschiede im EDSS-Score noch die Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens neuer Schübe während der Laufzeit der Studie signifikant waren, ist es dennoch bemerkenswert, dass die Natalizumab-Gruppe insgesamt schlechter abschnitt als die Placebogruppe. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte man vermuten, dass die interventionelle Therapie mit Natalizumab insbesondere die Einwanderung der zahlenmäßig erst spät ansteigenden Population der regulatorischen T-Zellen in das ZNS verhindert, und dass diesen entscheidende Aufgaben in der Gegenregulation einer inflammatorischen Antwort zukommen. Auf diese Weise könnte die therapeutische Interaktion mit Adhäsionsmolekülen an der BHS zu einer verzögerten Erholung und einem höheren Risiko für das Wiederaufflammen entzündlicher Läsionen führen.

Diese Überlegungen machen das Dilemma der derzeit vorhandenen Möglichkeiten einer Therapie an der BHS deutlich. Ohne Zweifel existieren potente Medikamente, die die Transmigration von Entzündungszellen in das ZNS stark unterdrücken können, wie es kürzlich für Natalizumab gezeigt wurde (Polman et al., 2006; Rudick et al., 2006).

Trotzdem gibt es keine klare Vorstellung bezüglich der Zeitpunktes und der Dauer der Anwendung. Eine ständige Interaktion mit molekularen Vorgängen an der BHS kann z.B. zu einer reduzierten Überwachungsleistung des Immunsystems und damit zu einem erhöhten Risiko opportunistischer Infektionen führen, wie ebenfalls kürzlich aus den Natalizumab-Studien gelernt wurde (Stuve et al., 2006; Yousry et al., 2006). Die interventionelle Anwendung dieser Substanzen könnte das Risiko opportunistischer Infektionen umgehen. Dennoch hat es den Anschein, dass diese interventionellen Ansätze eher zu spät in das Geschehen eingreifen und, in Analogie zu dieser tierexperimentellen Studie, mehr Schaden als Nutzen bringen könnten, weil die späte Intervention eine Einwanderung regulatorischer Elemente in das ZNS verhindern könnte.

Aus diesen Gründen wäre es äußerst sinnvoll, Bildgebungsstrategien für die Anwendung und Therapieüberwachung neuer biopharmazeutischer Substanzen zu besitzen. Diese bildgebenden Verfahren sollten in der Lage sein, entzündliche Aktivität und die Ausbildung von Läsionen in frühesten Stadien zu erfassen und gleichzeitig zwischen proinflammatorischen und regulatorischen bzw. antiinflammatorischen Reaktionen zu unterscheiden. Die heutigen morphologisch orientierten bildgebenden Verfahren erfüllen diese Anforderungen nicht. Es besteht also ein großer Bedarf an der Entwicklung molekularer bildgebender Techniken, die es erlauben, molekulare Expressionsmuster und biologische Vorgänge in vivo in kranken und gesunden Individuen darzustellen.

4.2. Molekulare Bildgebung, ihre Möglichkeiten und Perspektiven

Die neuesten Fortschritte auf dem Gebiet bildgebender Verfahren haben gezeigt, dass die molekulare Bildgebung die präklinische Stufe erreicht hat (Weissleder und Mahmood, 2001). Derzeit werden verschiedene, auf optischen Methoden (Bremer et al., 2001), auf der Magnetresonanztomographie (MRT) (Sipkins et al., 2000) oder der Positronenemissionstomographie (PET) (Phelps, 2000) und der Single-Photon-Emission-Tomographie (SPECT) basierende Techniken untersucht.

Daneben ist der Ultraschall ein interessanter Kandidat für molekulare Bildgebung (Leong-Poi et al., 2003; Lindner et al., 2001). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, stellt die Anwendung der neuen SPAQ-Technologie eine interessante Möglichkeit dar, molekulare Ereignisse an der BHS zu untersuchen und ist somit ein attraktives Werkzeug für präklinische Studien am Tiermodell. In Kombination mit target-spezifischen Ultraschallkontrastmitteln liegt hier eine sehr sensitive und spezifische, tomographische Methode vor, die den Anforderungen an ein modernes molekulares Bildgebungsverfahren gerecht wird (Reinhardt et al., 2005). Die SPAQ-Technologie erlaubt die Erfassung selbst einzelner MP im Gewebe trotz der möglichen Signalabschwächung durch Mikropartikel-Zell-Interaktionen sowie die genaue Quantifizierung hoher MP-Konzentrationen. Sehr hohe Konzentrationen, welche die Grenze der Quantifizierbarkeit mittels SPAQ von etwa 300000 MP/ml überschreiten, werden in vivo ausser in Organen wie Leber und Milz praktisch nicht erreicht. Da sich die MP aufgrund ihrer Affinität zum retikuloendothelialen System in diesen beiden Organen jedoch auch unspezifisch anreichern, sind sie für eine Darstellung molekularer Marker mit dieser Technologie ohnehin ungeeignet, obwohl diese Eigenschaft durchaus eine gewisse Spezifität mit sich bringt.

Darüber hinaus verfügt die SPAQ-Technologie über eine hohe räumliche Auflösung bis in den Bereich weniger Mikrometer. Im Vergleich dazu konnte mit anderen US-basierten Methoden eine Schichtdicke von einem Millimeter bisher nicht unterschritten werden (Reinhardt et al., 2005). Da die hohe Auflösung bei der SPAQ-Technologie aus der Paralleltranslation zwischen Schallkopf und Zielgewebe resultiert, ist sie auch bei Verwendung niedrigerer US-Frequenzen gegeben, die im konventionellen US zu einer Herabsetzung der räumlichen Auflösung führen würden. Da niedrigere Schallfrequenzen tiefer in das Gewebe eindringen können, erlaubt die Methode also die Quantifizierung auch tiefer liegender Strukturen, ohne damit Einbußen in der Raumauflösung in Kauf nehmen zu müssen. Daneben bieten niedrigere Schallfrequenzen aufgrund ihrer höheren Schallamplitude den Vorteil, Mikropartikel effektiver zu zerstören als höhere Frequenzen (Reinhardt et al., 2005). Die Kombination der SPAQ-Technologie mit hochfrequenten Ultraschallgeräten, die in Bereichen von 40 bis über 200 MHz arbeiten, würde diese Methode auch für Anwendungen auf dem mikroskopischen Gebiet interessant machen und beispielsweise die Untersuchung

molekularer Prozesse an kleinsten Gefäßen oder die intraoperative Schnellschnittuntersuchung auf sowohl zellmorphologischer als auch molekularer Ebene erlauben.

Die SPAQ-Technologie in Verbindung mit molekülspezifischen MP ist in der Lage, endothelial exprimierte Marker beim Versuchstier an mehreren aufeinanderfolgenden Zeitpunkten sicher und ohne Einfluss auf den Krankheitsverlauf der EAE in Echtzeit zu untersuchen und zu quantifizieren. In anderen Studien unserer Gruppe konnte mit der gadoliniumverstärkten Kernspintomographie und mittels Albuminfärbung eine mögliche Störung der BHS durch wiederholte US-Untersuchung des Gehirns sowie durch das Platzen gebundener MP an der BHS ausgeschlossen werden (Linker et al., 2005). Ein funktioneller, klinisch erkennbarer Einfluss auf die BHS im Sinne einer Blockade von Adhäsionsmolekülen und der dadurch verursachten Störung der Leukozytenmigration durch spezifisch bindende MP konnte, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ebenfalls ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit der sequentiellen Messung in vivo erlaubt die Erfassung intraindividuelle Verläufe und trägt damit dazu bei, die Anzahl an benötigten Versuchstieren zu reduzieren.

Auch die Untersuchung bewegter Organe wie Lunge und Herz mit SPAQ und spezifischen MP ist, z.B. mit Hilfe einer EKG-synchronen Triggerung von Schallkopf und Vorschubapparatur, prinzipiell möglich (Reinhardt et al., 2005). Da die SPAQ-Technologie neben der hohen räumlichen Auflösung die dem US eigene hohe zeitliche Auflösung mit sich bringt, ist sie für die Anwendung an bewegten Organen ebenfalls gut geeignet. Kommerzielle klinische US-Geräte erreichen mittlerweile Bildwiederholungsraten von über 200 pro Sekunde (Liang, Blomley, 2003).

Die größte Zukunftsperspektive für die hochsensitive, quantifizierbare molekulare Bildgebung in vivo besitzt momentan die PET (Phelbs, 2000), die auch schon erfolgreich in der klinischen Diagnostik zum Einsatz kommt. Radionuklide können in sehr geringen Mengen verwendet werden und befinden sich durch ihre relativ kurze Halbwertszeit nicht lange im Organismus. Dies lässt die wiederholte Untersuchung des gleichen Individuums innerhalb kürzerer Zeit zu. Dennoch bedeuten Untersuchungen mit radionuklidbasierten Methoden immer eine Strahlenbelastung. Ausserdem erfordern die Generierung, der Transport und die Anwendung der Radionuklide einen hohen

logistischen Aufwand, die Einhaltung strikter Sicherheitsvorschriften und sind zudem sehr kostenintensiv. Da die räumliche Auflösung auch von höherauflösenden Kleintier-PET und -SPECT derzeit im Millimeterbereich liegt, sind diese Verfahren bisher nur in Kombination mit der CT oder der MRT in der Lage, neben der Kontrastmittelaufnahme und -verteilung auch anatomische Details befriedigend aufzulösen.

Mit der Kernspintomographie ist eine Darstellung molekularer Marker in vivo zwar ebenfalls möglich, die Realisierung sequentieller Untersuchungen und die Anwendung auch am Menschen in naher Zukunft erscheinen jedoch aufgrund einiger gravierender inherenter Nachteile der Methode schwierig. Die MRT benötigt lange Messzeiten, verwendet teils potentiell toxische Kontrastmittel, die wegen der geringen Sensitivität in hohen Dosen injiziert werden müssen und zum Teil sehr lange Halbwertszeiten im Körper besitzen (Hildebrandt, Gambhir, 2004). Ein weiteres Problem in der MRT-basierten molekularen Bildgebung stellt die bisher unzureichende Quantifizierbarkeit der gemessenen Signale dar (Sipkins et al., 2000).

Optische Verfahren, die auf der Messung von Fluoreszenz oder Biolumineszenz beruhen, sind kostengünstig und sehr sensitiv, besitzen aber die Nachteile, eine relativ niedrige räumliche Auflösung im Millimeterbereich zu besitzen und durch Lichtabsorption und -streuung in Gewebe und Blut auf oberflächliche Prozesse bzw. vor allem auf die Untersuchung von Kleintieren beschränkt zu sein. Neuere Farbstoffe im Infrarotbereich (Sevick-Muraca et al., 2002) und die Schichtbilddetektion mit rotierenden Sensoren (Fluoreszenz Molecular Tomographie) (Ntziachristos et al., 2002) sind Entwicklungen, mit denen versucht wird, die in vivo-Anwendbarkeit dieser Methoden zu verbessern.

Die Darstellung molekularer Geschehen am Endothel mittels US hat in den letzten Jahren beachtliche Fortschritte gemacht. Bereits heute können im experimentellen Rahmen eine Reihe pathologischer Prozesse wie Entzündung, Angiogenese, Atherosklerose sowie Thrombosen erfolgreich detektiert werden. Die Herausforderungen für die Zukunft liegen in der Verbesserung der Kontrastmittel in Hinblick auf die vereinfachte Konjugation mit spezifischen Liganden, der besseren Charakterisierung des akustischen Verhaltens von USKM, der Optimierung der Detektion und der ultraschallunterstützten Anwendung von Medikamenten.

Existierende Alternativen zu Gas-oder Luftgefüllten MP sind echogene Liposomen (Alkan-Onyuksel et al., 1996; Demos et al., 1997, 1998, 1999) und Emulsionen aus Perfluorocarbon (Lanza et al., 1996, 1997, 2000). Beide haben aufgrund ihres im Vergleich zu herkömmlichen MP kleineren Durchmessers von unter einem Mikrometer ein anderes Verteilungsverhalten im Kreislauf als herkömmliche MP, sind widerstandsfähiger gegen mechanische Scherkräfte und damit kreislaufstabiler und sind ebenso wie herkömmliche MP koppelbar an Markerliganden wie etwa monoklonale Antikörper. Perfluorocarbon-Nanopartikel besitzen den Vorteil, in frei flottierendem Zustand im Kreislaufsystem eine verminderte Echogenität zu besitzen womit unspezifische Hintergrundsignale deutlich vermindert sind. Ausserdem lassen sie sich durch die Einarbeitung von Gadoliniumverbindungen auch als MR-Kontrastmittel verwenden (Liang, Blomley, 2003).

Zukünftige Anwendungsbereiche des kontrastmittelverstärkten US sind die Tumorfrüherkennung, die Detektion von Metastasen sowie die Lokalisation venöser Thrombosen. Daneben sind viele entzündliche Prozesse wie Autoimmunerkrankungen, arteriosklerotischer Plaques, Transplantatabstoßung und Ischämien aufgrund der molekularen Interaktionen zwischen Entzündungszellen und Gefäßwand prädestiniert für die US-basierte Bildgebung (Mäurer, 2005; Jonathan, Lindner, 2004; Liang, Blomley, 2003). Auf experimenteller Ebene sind diese Möglichkeiten bereits gut etabliert. Wie bei der EAE könnte die US-basierte molekulare Bildgebung auch bei anderen Erkrankungen eine große Hilfe in der Therapiekontrolle und -überwachung darstellen. Eine andere, interessante Verwendung spezifischer MP und US ist die gewebespezifische Applikation von Chemotherapeutika (Harrison et al., 1996) und anderen Medikamenten sowie von genetischem Material (Chen et al., 2001).

Molekülspezifische MP reichern sich am Zielort im Organismus an und können ihren Inhaltsstoff durch Beschallung mit hohen Schalldrücken und das konsekutive Platzen der MP freigeben. Zusätzlich erhöhen die Ultraschallwellen durch ein als „Sonifikation“ bezeichnetes Phänomen die Permeabilität der Zellmembran und verstärken auf diese Weise die Aufnahme freigesetzter Stoffe in die Zelle. Alleine die Zerstörung von MP an Thromben hat scheinbar thrombolytische Effekte (Tachibana et al., 1995).

Die ultraschallbasierten Techniken bieten mit der Vereinigung von hoher Sensitivität und Spezifität, einer hohen räumlichen Auflösung, der geringen Invasivität, der

fehlenden Strahlenbelastung, der Einfachheit der Durchführung und nicht zuletzt den wesentlich geringeren Kosten einige Vorteile gegenüber anderen Verfahren und stellen - trotz ihres auf endovaskuläre Prozesse eingeschränkten Einsatzspektrums - eine vielversprechende Methode für eine größere Zahl zukünftiger Anwendungsbereiche dar. Weil die Ultraschall-Technologie fast überall zur Verfügung steht, kosteneffektiv ist und eine zuverlässige Quantifizierung ermöglicht, besitzt sie das Potential, auch für die Anwendung beim Menschen ein Werkzeug für molekulare Bildgebung zu werden. Momentan liegt das große Potential dieser Technologie jedoch vor allem in der Bildgebung kleiner Tiere mit dem Ziel, weitere, für die Entstehung von entzündlichen Läsionen relevante Marker zu identifizieren, und die Kenntnisse über die Mechanismen der T-Zell-Migration in der EAE und der MS zu erweitern. Die diese Technik für menschliches Gehirn und Rückenmark hauptsächlich limitierenden Hindernisse sind Schädelknochen und Wirbelsäule, deren hohe Schallabsorption nur die Untersuchungen durch sog. Schallfenster erlaubt.

Die Ergebnisse histopathologischer und immunologischer Studien lassen den Verdacht aufkommen, der MS als klinisches Syndrom könnten primär pathogenetisch unterschiedliche, immunologisch vermittelte oder oligodendropathisch-dystrophe bzw. degenerative Prozesse zugrunde liegen (Lucchinetti et al., 2000). Histopathologisch lassen sich 4 Subtypen der MS abgrenzen. Interessanterweise zeigen die Läsionen trotz der teilweise von Person zu Person unterschiedlichen Pathologien eine hohe intraindividuelle Homogenität, was auf verschiedene, aber innerhalb eines Patienten konstante Foci bei der Entmarkung im ZNS hindeutet (Noseworthy, 2000). In Hinblick auf mögliche individualisierte, auf den entsprechenden Subtyp der MS zugeschnittenen Therapieformen lässt die molekulare Bildgebung auf neue Wege hoffen, Unterformen der MS nicht-invasiv, schnell und sicher anhand geeigneter Markerkonstellationen und Expressionsmuster diagnostizieren und klassifizieren zu können. Entsprechend könnten derartige Marker bzw. Surrogatmarker auch die frühe Diagnose einer MS im Falle uneindeutiger diagnostischer Parameter bzw. die Abgrenzung gegenüber anderen Erkrankungen erleichtern.

Die Umsetzung der unterschiedlichen Modalitäten der molekularen Bildgebung auch im klinischen Feld, gerade in Hinblick auf die neuesten Entwicklungen im medikamentösen Bereich, stellt aber weiterhin eine große Herausforderung dar, um

schließlich bessere Möglichkeiten zu besitzen, dem behandelnden Arzt bei der Therapie mit biopharmazeutischen Medikamenten sinnvolle Leitfäden für deren Anwendung anbieten zu können. Für die Anwendung am Menschen wird die molekulare Bildgebung in Zukunft vermehrt zu einem hochinteressanten und vielversprechenden Feld in Forschung, Diagnostik und Therapie werden. Ihr Ziel wird es sein, Krankheitsmechanismen auf molekularer Ebene besser zu verstehen und diese vor ihrer morphologischen und dann therapeutisch häufig schwieriger anzugehenden Manifestation zu erkennen und Krankheiten dadurch früher, gezielter und effizienter behandeln zu können.

5. Zusammenfassung

Der adoptive Transfer myelinspezifischer, enzephalithogener T-Lymphozyten führt bei Lewis-Ratten zu einer monophasisch verlaufenden Enzephalomyelitis (AT-EAE). Das Tiermodell AT-EAE ist gut geeignet, um die Transmigration von Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ins Hirngewebe zu untersuchen. Der Einwanderung aktivierter Lymphozyten in das ZNS-Parenchym geht eine komplexe Kaskade von Zell-Zell-Interaktionen zwischen Lymphozyten und Endothel der BHS voraus. Die endothelialen Adhäsionsmoleküle Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) und Vascular Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) sind entscheidend an diesem Prozess beteiligt.

Mit einer kürzlich entwickelten, ultraschallbasierte molekulare Bildgebung und Quantifizierung ist die sequentielle Messung der Moleküle ICAM-1 und VCAM-1 im Verlauf der AT-EAE am lebenden Tier möglich. Schon vor dem Einsetzen der ersten klinischen Symptomatik zeigte sich bei den Versuchstieren ein Anstieg der Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1- und VCAM-1. Diese Expression persistierte unerwartet über das Maximum der klinischen Symptomatik hinaus und bis in die Phasen der frühen Remission. Immunhistochemische Färbungen von Gehirn und Rückenmark bestätigten diese Expressionskinetik in situ.

Darüber hinaus konnte histologisch und durchflusszytometrisch eine Persistenz CD4-positiver Lymphozyten in der frühen Remissionphase nachgewiesen werden. Hier war vor allem ein Anstieg der CD4- und FoxP3- positiven regulatorischen T-Zellen in der CD4 Subpopulation festzustellen. Diesen Zellen wird eine wichtige regulatorische Bedeutung für die Beendigung von Entzündungsreaktionen zugeschrieben.

Ein experimenteller Beleg dafür, dass regulatorische Zellen in den Phasen der Remission die selben Migrationswege wie proinflammatorische Zellen nutzen, ergab sich durch die Blockade von ICAM-1 mit hohen Dosen eines monoklonalen Antikörpers. Wurde dieser AK in der Progressionsphase der Erkrankung gegeben, resultierte dies in einer signifikanten Reduktion der klinischen Symptomatik. Im Gegensatz dazu führte die spätere Gabe des Antikörpers in der frühen Remission zu einer signifikanten Verschlechterung des Krankheitsverlaufes.

In Zusammenschau legen diese Ergebnisse die Hypothese nahe, dass Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 nicht nur an der Einwanderung pathogener proinflammatorischer Zellen entscheidend beteiligt sind, sondern dass sie auch die Einwanderung antiinflammatorischer und regulatorischer Zellen in das ZNS ermöglichen, die für eine Abschwächung der Gewebsentzündung und Zerstörung wichtig sind. Therapeutische Intervention an der BHS sind auf dem Boden dieser Erkenntnisse wahrscheinlich stadienabhängig wirksam und könnten bei falschem Einsatz mehr schaden als nutzen. Molekulare Bildgebungstechniken, wie hier paradigmatisch für die ultraschallbasierten SPAQ-Technologie gezeigt, werden deshalb in Zukunft für die Bestimmung der geeigneten Phase einer entzündlichen ZNS Erkrankung und damit den geeigneten Zeitpunkt für eine therapeutische Intervention großes Potential erlangen.

6. Literaturverzeichnis

Alkan-Onyuksel H, Demos SM, Lanza GM, Vonesh MJ, Klegerman ME, Kane BJ, et al. (1996) Development of inherently echogenic liposomes as an ultrasonic contrast agent. *J Pharm Sci*;85:486–90.

Archelos JJ, Jung S, Mäurer M, Schmied M, Lassmann H, Tamatani T, Miyasaka M, Toyka KV, Hartung HP (1993) Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by an antibody to the intercellular adhesion molecule ICAM-1. *Ann. Neurol* 34:145-54

Archelos JJ, Hartung HP (1997) The role of adhesion molecules in multiple sclerosis: biology, pathogenesis and therapeutic implications. *Mol Med Today*. 3(7):310-21.

Bluestone JA, Tang Q (2005) How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr. Opin. Immunol.* 17:638-42

Bremer C, Bredow S, Mahmood U, Weissleder R, Tung CH (2001) Optical imaging of matrix metalloproteinase-2 activity in tumors: feasibility study in a mouse model. *Radiology* 221:523-9

Chen SY, Shohet RV, Frenkel P, Mayer S, Unger RH, Grayburn PA. (2001) Successful expression of plasmid DNA in rat myocardium by ultrasound-targeted microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol* 37:407A.

Demos SM, Onyuksel H, Gilbert J, Roth SI, Kane B, Jungblut P, et al. (1997) In vitro targeting of antibody-conjugated echogenic liposomes for site-specific ultrasonic image enhancement. *J Pharm Sci* 86:167–71.

Demos SM, Dagar S, Klegerman M, Nagaraj A, McPherson DD, Onyuksel H. (1998) In vitro targeting of acoustically reflective immunoliposomes to fibrin under various flow conditions. *J Drug Target* 5:507–18.

Demos SM, Alkan-Onyuksel H, Kane BJ, Ramani K, Nagaraj A, Greene R, et al. (1999) In vivo targeting of acoustically reflective liposomes for intravascular and transvascular ultrasonic enhancement. *J Am Coll Cardiol* 33:867–75.

Ellegala DB, Leong-Poi H, Carpenter JE et al. (2003) Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to $\alpha(v)\beta_3$. *Circulation* 108:336–341

Engelhardt B, Conley FK, Butcher EC (1994) Cell adhesion molecules on vessels during inflammation in the mouse central nervous system. *J Neuroimmunol.* 51(2):199-208.

Engelhardt B, Vestweber D, Hallmann R, Schulz M (1997) E- and P-selectin are not involved in the recruitment of inflammatory cells across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 90:4459–4472

Engelhardt B, Laschinger M, Schulz M, Samulowitz U, Vestweber D, Hoch G. (1998) The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires α_4 -integrin but not $\alpha_4\beta_7$ -integrin. *J Clin Invest.* 102(12):2096-105.

Engelhardt B (1998) The role of α_4 -integrin in T lymphocyte migration into the inflamed and noninflamed central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol* 231:51–64

Engelhardt B (2006) Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J. Neural Transm.* 113:477-85

Fox RJ, Ransohoff RM (2004) New directions in MS therapeutics: vehicles of hope. Trends Immunol 25:632–636

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

Harrison GH, BalcerKubiczek EK, Gutierrez PL (1996) In vitro mechanisms of chemopotentialiation by tone-burst ultrasound. Ultrasound Med Biol 22:355–62.

Hartung HP, Schafer B, Heininger K, Stoll G, Toyka KV (1988) The role of macrophages and eicosanoids in the pathogenesis of experimental allergic neuritis. Serial clinical, electrophysiological, biochemical and morphological observations. Brain 111 (Pt 5):1039-59

Hauff P, Fritsch T, Reinhardt M et al. (1997) Delineation of experimental liver tumors in rabbits by a new ultrasound contrast agent and stimulated acoustic emission. Invest Radiol 32:94–99

Hauff P, Reinhardt M, Briel A et al. (2004) Molecular targeting of lymphnodes with L-selectin ligandspecific US contrast agent: a feasibility study in mice and dogs. Radiology 231:667–673

Hildebrandt IJ Gambhir SS (2004) Molecular imaging applications for immunology. Clinical Immunology 111 210– 224

Jonathan R, Lindner MD (2004) Molecular imaging with contrast ultrasound and targeted microbubbles J Nucl Card. 01.003

Lanza GM, Wallace KD, Scott MJ, Cacheris WP, Abendschein DR, Christy DH, et al. (1996) A novel site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application.

Circulation 94:3334–40.

Lanza GM, Wallace KD, Fischer SE, Christy DH, Scott MJ, Trousil RL, et al. (1997) High-frequency ultrasonic detection of thrombi with a targeted contrast system.

Ultrasound Med Biol 23:863–70.

Lanza GM, Abendschein DR, Hall CS, Scott MJ, Scherrer DE, Houseman A, et al. (2000) In vivo molecular imaging of stretch-induced tissue factor in carotid arteries with ligandtargeted nanoparticles. J Am Soc Echocardiogr 13:608–14.

Laschinger M, Engelhardt B (2000) Interaction of alpha4-integrin with VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to brain endothelium but not in their transendothelial migration in vitro. J Neuroimmunol. 102(1):32-43

Laschinger M, Vajkoczy P, Engelhardt B (2002) Encephalitogenic T cells use LFA-1 for transendothelial migration but not during capture and initial adhesion strengthening in healthy spinal cord microvessels in vivo. Eur. J. Immunol. 32:3598-606

Lee SJ, Benveniste EN (1999) Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. J. Neuroimmunol. 98:77-88

Leong-Poi H, Christiansen J, Klibanov AL et al. (2003) Noninvasive assessment of angiogenesis by ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)-integrins. Circulation 107:455–460

Liang H-D Blomley MJK (2003) The role of ultrasound in molecular imaging. Brit J Rad 76, S140–S150

Lindner JR, Coggins MP, Kaul S et al. (2000) Microbubble persistence in the microcirculation during ischemia/reperfusion and inflammation is caused by integrin- and complement-mediated adherence to activated leukocytes. *Circulation* 101:668–675

Lindner JR, Song J, Christiansen J et al. (2001) Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted to P-selectin. *Circulation* 104:2107–2112

Lindner JR (2004) Molecular imaging with contrast ultrasound and targeted microbubbles. *J Nucl Cardiol.* 11(2):215-21.

Linker RA, Mäurer 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. *Nat. Med.* 8:620-4

Linker RA, Reinhardt M, Bendszus M, Ladewig G, Briel A, Schirner M, Maurer M, Hauff P (2005) In vivo molecular imaging of adhesion molecules in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Autoimmun.* 25:199-205

Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. (1996) Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6:259-74.

Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. (1998) Multiple sclerosis: lessons from neuropathology. *Semin Neurol* 18:337-49.

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. (1999) A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions: a study of 113 cases. *Brain* 122:2279-95.

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-17.

Morrissey SP, Deichmann R, Syha J, Simonis C, Zettl U, Archelos JJ, Jung S, Stodal H, Lassmann H, Toyka KV, Haase A, Hartung HP (1996) Partial inhibition of AT-EAE by an antibody to ICAM-1: clinico-histological and MRI studies. *J. Neuroimmunol.* 69:85-93

Mäurer M, Linker R, Reinhardt M, Hauff P (2005) Möglichkeiten targetspezifischer molekularer Bildgebung mit Ultraschallkontrastmitteln *Radiologe* 45:560–568

Ntziachristos V, Tung CH, Bremer C, Weissleder R (2002) Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. *Nat. Med.* 8 757– 760.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 343(13):938-52.

O'Connor PW, Goodman A, Willmer-Hulme AJ, Libonati MA, Metz L, Murray RS, Sheremata WA, Vollmer TL, Stone LA (2004) Randomized multicenter trial of natalizumab in acute MS relapses: clinical and MRI effects. *Neurology* 62:2038-43

Phelps ME (2000) Inaugural article: positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:9226-33

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW (2006) A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl. J. Med.* 354:899-910

Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP (1999) Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol* 46:144-60.

Reinhardt M, Hauff P, Briel A et al. (2005) Sensitive particle acoustic quantification (SPAQ): a new ultrasound-based approach for the quantification of ultrasound contrast media in high concentrations. *Invest Radiol* 40:2-7

Reinhardt M, Hauff P, Linker RA, Briel A, Gold R, Rieckmann P, et al. (2005) Ultrasound derived imaging and quantification of cell adhesion molecules in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by Sensitive Particle Acoustic Quantification (SPAQ). *Neuroimage*;27:267-78.

Rose JW, Welsh CT, Hill KE, Houtchens MK, Fujinami RS, Townsend JJ (1999) Contrasting effects of anti-adhesion molecule therapy in experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 97:110-8

Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue EW, Lublin FD, Weinstock-Guttman B, Wynn DR, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW (2006) Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl. J. Med.* 354:911-23

Sevick-Muraca EM, Houston JP, Gurfinkel M (2002) Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6 642- 650

Sipkins DA, Gijbels K, Tropper FD, Bednarski M, Li KC, Steinman L (2000) ICAM-1 expression in autoimmune encephalitis visualized using magnetic resonance imaging. *J. Neuroimmunol.* 104:1-9

Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H. (1998) Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 43:465-71.

Stuve O, Marra CM, Jerome KR, Cook L, Cravens PD, Cepok S, Frohman EM, Phillips JT, Arendt G, Hemmer B, Monson NL, Racke MK (2006) Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Ann Neurol*. 59:743-7

Tachibana K, Tachibana S (1995) Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation* 92:1148-50.

Uhlendorf V, Scholle FD, Reinhardt M. Acoustic behaviour of current ultrasound contrast agents. *Ultrasonics*. 2000;38:81– 86.

Vajkoczy P, Laschinger M, Engelhardt B (2001) Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. *J. Clin. Invest* 108:557-65

Weller GE, Lu E, Csikari MM, Klibanov AL et al. (2003) Ultrasound imaging of acute cardiac transplant rejection with microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1. *Circulation* 108:218–224

Wiendl H, Kieseier BC (2003) Disease-modifying therapies in multiple sclerosis: an update on recent and ongoing trials and future strategies. *Expert Opin Investig Drugs* 12:689–712

Weissleder R, Mahmood U (2001) Molecular imaging. *Radiology* 219:316-33

Willenborg DO, Simmons RD, Tamatani T, Miyasaka M (1993) ICAM-1-dependent pathway is not critically involved in the inflammatory process of autoimmune encephalomyelitis or in cytokine-induced inflammation of the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 45:147-54

Yousry TA, Major EO, Ryschkewitsch C, Fahle G, Fischer S, Hou J, Curfman B, Miszkiel K, Mueller-Lenke N, Sanchez E, Barkhof F, Radue EW, Jager HR, Clifford DB (2006) Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl. J. Med.* 354:924-33

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. M. Mäurer für die Überlassung des Themas, die gute Zusammenarbeit, die konstruktive Kritik und die stetige und zuverlässige Betreuung. Ausserdem möchte ich mich bedanken bei Herrn Prof. Dr. K. Toyka für die Gewährung eines Forschungsstipendiums sowie die konstruktive Kritik.

Weiterer Dank für einführende Erläuterungen und Hilfen gilt den Mitarbeitern der klinischen Forschungsgruppe für MS und Neuroimmunologie der Neurologischen Uniklinik Würzburg, Frau Dr. Gesa Ladewig, Frau Verena Wörtmann, Frau Dr. Antje Kroner-Milsch und Frau Barbara Michel sowie den Mitarbeitern der histologischen Abteilung der Klinik.

Lebenslauf

Name	Ralf <u>Sebastian</u> Doerck
Geburtsdatum/-ort	28.05.1979 in Würzburg
Anschrift	Pestalozzistrasse 6, 97080 Würzburg
Nationalität	deutsch
Familienstand/Kinder	ledig, 2 Töchter (4 J., 0 J.)
Schulbildung	
1985 – 1989	Grund- und Volksschule Würzburg-Lengfeld
1989 – 1998	Siebold-Gymnasium Würzburg
Schulabschluss	
26.06.1998	Abitur
Studium	Humanmedizin SS 1999 – SS 2005 an der Bayerischen Julius-Maximilian-Universität in Würzburg
27.03.2001	Ärztliche Vorprüfung
21.03.2002	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
30.03.2004	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2004-03/2005	Praktisches Jahr 04/2004 – 03/2005 in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie sowie Neurologie an der Universitätsklinik Würzburg
25.05.2005	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Anstellungen

07/2005 – 07/2006

Angestellter der Neurochirurgischen Gemeinschaftspraxis
Würzburg (Drs. Poimann, Popp, Schäfer) mit
assistenzärztlicher Tätigkeit an der Rotkreuzklinik
Würzburg

seit 10/2006

Assistenzarzt an der
Neurologischen Universitätsklinik Würzburg

Doktorarbeit

08/2005-08/2006

In vivo-Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle
ICAM-1 und VCAM-1 bei der experimentellen
autoimmunen Enzephalomyelitis: Untersuchungen mit
target-spezifischen Ultraschallkontrastmitteln

Doktorvater: Privatdozent Dr. M. Mäurer
Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität
Würzburg

Würzburg, 01.03.2007