

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>9</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Guillain-Barré Syndrom (GBS)</b>	<b>11</b>
1.1.1 Klinische Symptomatik und Verlauf	11
1.1.2 Pathologie	12
1.1.3 Pathogenese	12
1.1.4 Verschiedene Formen des GBS	14
1.1.4.1 Acute Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy (AIDP)	15
1.1.4.2 Acute Motor Axonal Neuropathy (AMAN)	15
1.1.4.3 Acute Motor and Sensory Axonal Neuropathy (AMSAN)	16
1.1.4.4 Miller Fisher Syndrome (MFS)	16
1.1.5 Assoziation von Infektionskrankheiten mit dem GBS	16
1.1.6 Hypothesen zur Entstehung des GBS als postinfektiöse Autoimmunerkrankung	17
<b>1.2 Experimentelle autoimmune Neuritis (EAN)</b>	<b>19</b>
<b>1.3 <i>Campylobacter jejuni</i></b>	<b>21</b>
1.3.1 Geschichte und Bedeutung	21
1.3.2 Biologie	21
1.3.3 Epidemiologie und Übertragung	21
1.3.4 Klinik	22
1.3.5 Pathogenese	22
1.3.6 Serotypen	22
<b>1.4 Ziel der Arbeit</b>	<b>23</b>

---

<b>2</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Evaluation der Neuritogenität von <i>C. jejuni</i>-Antigenpräparationen in Ratten</b>	<b>25</b>
2.1.1	Immunisierung mit Gesamt- <i>C. jejuni</i> und Kontrollantigenen	25
2.1.2	Proteinfractionen von <i>C. jejuni</i> 5646 und 5647	26
2.1.3	Immunisierung von DA-Ratten mit Gesamt- <i>C. jejuni</i>	27
<b>2.2</b>	<b>Mögliche Beeinflussung einer AT-EAN durch vorherige Induktion einer Immunreaktion gegen <i>C. jejuni</i></b>	<b>27</b>
2.2.1	Gesamt- <i>C. jejuni</i>	27
2.2.2	<i>C. jejuni</i> -LPS	29
2.2.3	Serologische Untersuchungen	33
<b>2.3</b>	<b>Einfluß von <i>C. jejuni</i>-LPS auf die orale Induktion einer antigenspezifischen Immuntoleranz durch Fütterung von bovinem Myelin</b>	<b>34</b>
2.3.1	Klinischer Verlauf	34
2.3.2	Serologische Untersuchungen	37
<b>2.4</b>	<b>Einflüsse enteraler <i>C. jejuni</i>-Antigene auf die aktive Induktion einer Myelin-EAN</b>	<b>38</b>
2.4.1	Klinischer Verlauf	38
2.4.2	Histologische Untersuchungen	45
<b>2.5</b>	<b>Zelluläre Untersuchungen in der Lewis-Ratte</b>	<b>48</b>
2.5.1	Generierung <i>C. jejuni</i> -spezifischer Ratten-Zell-Linien	48
2.5.2	I.V. Gabe von <i>C. jejuni</i> -spezifischen Ratten-Zellen	50
2.5.3	Phänotyp <i>C. jejuni</i> -spezifischer Ratten-Zell-Linien	50
<b>2.6</b>	<b>Herstellung monoklonaler Antikörper gegen <i>C. jejuni</i>-LPS</b>	<b>51</b>
2.6.1	Reaktivität im ELISA	51
2.6.2	Reaktivität der mAk im Western Blot	56
2.6.3	Reaktivität im Dot Blot	58
2.6.4	Makro-Patch-Clamp Untersuchungen des Effektes <i>C. jejuni</i> -spezifischer Antiseren und Antikörper auf die neuromuskuläre Übertragung	59

---

<b>2.7</b>	<b>Etablierung <i>C. jejuni</i>-spezifischer humaner T-Zell-Linien</b>	<b>61</b>
2.7.1	Zelluläre Immunantwort gegen Gesamthomogenat von <i>C. jejuni</i>	61
2.7.2	Zelluläre Immunantwort gegen <i>C. jejuni</i> -Protein und <i>C. jejuni</i> -LPS	65
2.7.3	Kreuzreaktivität <i>C. jejuni</i> -spezifischer T-Zell-Linien mit Myelinantigenen	69
2.7.4	<i>C. jejuni</i> -spezifische humane T-Zellen sind MHC-Klasse II restringiert	74
2.7.5	<i>C. jejuni</i> -spezifische T-Zell-Linie NK-3 ist HLA-DR-11 restringiert	78
2.7.6	Phänotyp <i>C. jejuni</i> -spezifischer humaner T-Zellen	80
<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>82</b>
<b>3.1</b>	<b>Zelluläre Mechanismen</b>	<b>82</b>
3.1.1	Aktive Immunisierung von Ratten mit <i>C. jejuni</i> -Antigen	82
3.1.2	Generierung von <i>C. jejuni</i> -spezifischen Ratten-T-Zellen	83
3.1.3	Generierung von <i>C. jejuni</i> -spezifischen humanen T-Zellen	85
<b>3.2</b>	<b>Humorale Mechanismen</b>	<b>90</b>
3.2.1	Immunisierung mit <i>C. jejuni</i> -Antigenen und Induktion einer AT-EAN	90
3.2.2	Elektrophysiologische Untersuchungen von <i>C. jejuni</i> -Immunseren	93
3.2.3	Generierung monoklonaler Antikörper gegen <i>C. jejuni</i>	94
<b>3.3</b>	<b>Immuntoleranz</b>	<b>97</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>100</b>
<b>4.1</b>	<b>Chemikalien und Geräte</b>	<b>100</b>
4.1.1	Chemikalien	100
4.1.2	Medien für die Zellkultur	101
4.1.3	Geräte	102
4.1.4	Sonstiges	102
<b>4.2</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>103</b>
<b>4.3</b>	<b>Bakterienanzucht</b>	<b>103</b>

---

<b>4.4</b>	<b>Antigengewinnung</b>	<b>104</b>
4.4.1	Bakteriengesamthomogenat	104
4.4.2	Äußere Membran-Proteine (OMPs)	104
4.4.3	Fraktionen der äußeren Membran-Proteine	104
4.4.4	Lipopolysaccharide	105
4.4.5	Pronase-Verdau von Lipopolysacchariden	105
4.4.6	Myelinpräparation (BPM)	105
4.4.7	Präparation des Myelinproteins P2 (P2-Protein)	106
4.4.8	Basisches Myelinprotein vom Meerschweinchen (GP-MBP)	107
<b>4.5</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden</b>	<b>108</b>
4.5.1	Versuchstiere	108
4.5.2	Induktion von oraler Toleranz	108
4.5.3	Induktion von aktiver experimenteller autoimmuner Neuritis (EAN)	108
4.5.4	Bewertung des Krankheitsgrades	109
<b>4.6</b>	<b>Histologie</b>	<b>109</b>
4.6.1	Perfusion und Präparation	109
4.6.2	Kunsthharzeinbettung	110
4.6.3	Paraffineinbettung	111
4.6.4	Hämalaun-Eosin-Färbung	111
4.6.5	Immunzytochemie an Paraffinschnitten	112
<b>4.7</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>113</b>
4.7.1	Sterilisation	113
4.7.2	Proliferationsassay	113
<b>4.8</b>	<b>Enzym-gekoppelter Immunoabsorptions-Assay (ELISA)</b>	<b>113</b>
<b>4.9</b>	<b>SDS-Gelelektrophorese</b>	<b>114</b>

---

<b>4.10</b>	<b>Herstellung monoklonaler Antikörper</b>	<b>116</b>
4.10.1	B-Zell-Fusion	116
4.10.2	Austestung der Antikörper-Reaktivität	117
4.10.2.1	mittels ELISA	117
4.10.2.2	mittels Western Blot mit Immunfärbung	117
4.10.2.3	mittles Dot Blot	119
4.10.3	Isolierung des Antikörpers aus Kulturüberstand	119
<b>4.11</b>	<b>Humane <i>C. jejuni</i>-spezifische T-Lymphozytenlinien</b>	<b>120</b>
4.11.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut und Primärstimulation mit <i>C. jejuni</i> -Antigen	120
4.11.2	Erste antigenabhängige Restimulation von T-Zell-Kulturen	121
4.11.3	Weitere Restimulationen zur Expansion der T-Zell-Linien	121
4.11.4	Proliferationsassay und Austestung der Restriktion	121
4.11.5	Bestimmung des Phänotyps mittels Immun-Durchflußzytometrie	122
<b>4.12</b>	<b>Elektrophysiologische Untersuchungen</b>	<b>122</b>
<b>5</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>125</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>138</b>
	<b>PUBLIKATIONS LISTE</b>	<b>139</b>
	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>140</b>



## Summary

The present study evaluates the putative pathogenic role of a *Campylobacter jejuni* directed immune response in the pathogenesis of acute neuropathies.

Among other *C. jejuni* strains, strains isolated from Guillain-Barré- (GBS) and Miller-Fisher syndrome (MFS) patients were used for this investigation. By sonication, total homogenate of different *C. jejuni* strains and *Salmonella typhimurium*, which served as a control, were prepared. Additionally, different protein fractions and bacterial lipopolysaccharides (LPS) were isolated.

Immunization of rats with *C. jejuni* preparations did not lead to clinical manifestation of active experimental autoimmune neuritis (EAN). Furthermore, the severity of adoptive transfer-EAN (AT-EAN), induced by adoptively transferred P2-specific T cells was not altered in rats that had been previously immunized with *C. jejuni* for production of high anti-*C. jejuni* antibody titers.

*C. jejuni*-specific T cell lines were generated from Lewis rats immunized with *C. jejuni* proteins. These T cells proliferated in an antigen-specific manner in the presence of extracts from different *C. jejuni* strains. *C. jejuni*-specific rat T cells did not show any cross-reactive proliferation to peripheral nervous system (PNS) antigens. Furthermore, it was not possible to induce neuritis by adoptive transfer of *C. jejuni*-specific T cells *in vivo*.

Oral application of myelin antigens induces oral tolerance which renders rats resistant to actively induced EAN. This observation led to analyse the immunological consequences of oral administration of *C. jejuni* LPS with respect to the induction of tolerance. *C. jejuni*/myelin-fed rats developed accelerated clinical signs of EAN compared to control animals. Thus, oral administration of *C. jejuni* HB 93-13 LPS inhibited the induction of myelin-specific oral tolerance.

In order to investigate the humoral immune response, monoclonal *C. jejuni*-specific antibodies were isolated by immunization of Balb/c mice with *C. jejuni* LPS preparations emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA). Splenocytes from primed animals were fused with myeloma cells. A number of monoclonal antibodies were characterized. These monoclonal antibodies were either specific for *C. jejuni* LPS or

*C. jejuni* proteins. These immunoglobulins were characterized to be predominantly IgM, but also IgG antibodies could be found. ELISA and western blot analysis verified cross-reactivity of antibodies with different *C. jejuni* strains. However, the antibodies were not able to recognize gangliosides.

Electrophysiological investigations were used to determine a possible blocking effect of *C. jejuni*-specific antibodies at the neuromuscular endplate. Alteration of neuromuscular transmission at the diaphragm of mice after applying dialysed sera of *C. jejuni* immunized rat, were investigated using patch-clamp. Several *C. jejuni* antisera were able to partially block the pre-synaptic quantal release. This effect was *C. jejuni*-specific and was not inducible by *Salmonella typhimurium* antisera or control sera, obtained from CFA immunized animals. Additionally, one of the generated monoclonal *C. jejuni* LPS specific IgG antibodies was able to block the quantal release.

Finally, we were able to generate human T cells reacting specifically with *C. jejuni* HB 93-13. For the first time it could be shown, that these cells respond to homogenates of other *C. jejuni* strains but not to *Salmonella typhimurium* homogenate. Specifically *C. jejuni* proteins but not *C. jejuni* LPS were recognized by the human T cell lines. The generated T cells were all HLA-DR restricted and identified to be CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>,  $\alpha/\beta$ -TCR<sup>+</sup>. A few of the *C. jejuni*-specific T cell lines demonstrated a strong cross-reactivity to a PNS-component, the recombinant human P2-protein and single P2-peptides.

This observation shows that *C. jejuni* induces a variety of antigen-specific and non-specific immune responses which are able to facilitate or even trigger autoimmunity against the PNS as occurring in GBS or the MFS.



## Zusammenfassung

Verschiedene mögliche Pathomechanismen einer *Campylobacter jejuni*-spezifischen Immunantwort bei der Entstehung akuter Immuneuropathien wurden untersucht.

Neben anderen wurden für die Untersuchungen auch *C. jejuni*-Stämme eingesetzt, welche von Guillain-Barré- (GBS) und Miller-Fisher-syndrome (MFS) Patienten isoliert worden waren. Es wurden Ultraschall-Gesamt-Homogenate der *C. jejuni* Stämme sowie von *Salmonella typhimurium* als Kontrollbakterium hergestellt. Anschließend wurden verschiedene Proteinfractionen isoliert und die Lipopolysaccharide (LPS) der Bakterien isoliert.

Durch Immunisierung von Ratten mit diesen *C. jejuni*-Präparationen konnten keine Krankheitszeichen der experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN) ausgelöst werden. Trotz Produktion hoher Titer *C. jejuni*-spezifischer Antikörper verlief in diesen Tieren eine anschließend durch P2-spezifische T-Lymphozyten induzierte adoptiv transferierte EAN (AT-EAN) nicht schwerer als in mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) kontrollimmunisierten Ratten. Nach Immunisierung mit *C. jejuni*-Protein wurden *C. jejuni*-spezifische T-Zellen von Lewis-Ratten gewonnen, die mit allen getesteten *C. jejuni*-Stämmen als Antigen reagieren, jedoch zeigten *C. jejuni*-spezifische Ratten-T-Zellen *in vitro* keine Kreuzreaktivität mit PNS-Antigenen und induzierten *in vivo* keine Neuritis.

Im Modell der EAN läßt sich durch Füttern des Antigens eine natürliche orale Toleranz induzieren, welche die Tiere gegen eine aktiv induzierte EAN resistent macht. Die immunologische Auswirkung der enteralen Gabe von *C. jejuni*-LPS auf die natürliche Immuntoleranz wurde untersucht. Dabei konnte bei diskrepanten Ergebnissen keine pathogene Bedeutung von enteralen *C. jejuni*-Antigenen in der Ratte festgestellt werden.

Zur Generation und Untersuchung *C. jejuni*-spezifischer monoklonaler Antikörper wurden Balb/c-Mäuse mit *C. jejuni*-LPS-Präparationen in CFA immunisiert und die Milzzellen dieser Tiere mit Maus-Myelomzellen fusioniert. Es konnte eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern etabliert werden. Selektive Spezifitäten der monoklonalen Antikörper für *C. jejuni*-LPS oder -protein wurden detektiert, die meisten der

monoklonalen Antikörper als IgM, einige als IgG charakterisiert. Die Antikörper reagieren mit allen getesteten *C. jejuni*-Stämmen sowohl im ELISA als auch im Western Blot kreuz. Eine Reaktivität der Antikörper mit verschiedenen Gangliosiden konnte nicht nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung eines elektrophysiologisch fassbaren blockierenden Effektes von *C. jejuni*-spezifischen Antikörpern wurden Makro-patch-clamp-Untersuchungen am Mäusezwerchfell mit dialysierten Seren von *C. jejuni*-immunisierten Ratten durchgeführt. Einige der *C. jejuni*-Antiseren blockierten die präsynaptische Quantenfreisetzung partiell. Dieser Effekt war *C. jejuni*-spezifisch und durch *Salmonella*-Antiserum oder Kontrollseren CFA-immunisierter Tiere nicht induzierbar. Ein von uns generierter monoklonaler IgG-Antikörper gegen *C. jejuni*-LPS wurde ebenfalls in Makro-patch-clamp-Untersuchungen getestet und blockierte die Quantenfreisetzung.

Weiterhin wurden humane T-Zellen gegen *C. jejuni* HB 93-13 generiert. Es konnte erstmals gezeigt werden, daß diese Zellen mit anderen *C. jejuni*-Stämmen, jedoch nicht mit Salmonellen, kreuzreagieren und ausschließlich Proteine jedoch nicht LPS erkennen. Die generierten Zellen sind alle HLA-DR restringiert und der Phänotyp wurde als CD 4<sup>+</sup>/CD 8<sup>-</sup>,  $\alpha/\beta$ -TZR<sup>+</sup> identifiziert.

Einige der *C. jejuni*-spezifischen T-Zell-Linien zeigten eine starke oder partielle Kreuzreaktivität mit humanem rekombinantem P2-Protein des PNS und mit einzelnen P2-Peptiden. Dieser Befund belegt erstmals, dass durch Konfrontation mit *C. jejuni* eine zelluläre Immunantwort angestoßen werden kann, die in autoimmuner Weise mit Myelinprotein des PNS kreuzreagiert.

# **1 Einleitung**

## **1.1 Guillain-Barré Syndrom (GBS)**

### **1.1.1 Klinische Symptomatik und Verlauf**

Das Guillain-Barré Syndrom wurde erstmals von Landry 1859 als Erkrankung mit generalisierter Extremitätenschwäche und distal betonten Gefühlsstörungen beschrieben (Landry 1859). Erst 1916 wurde das Krankheitsbild von Guillain, Barré und Strohl als eine Radikuloneuritis identifiziert und seitdem gilt eine „dissociation albumino-cytologique“, also eine Erhöhung des Eiweißes ohne Zellvermehrung im Liquor cerebrospinalis, als ein diagnostisches Kriterium (Guillain et al. 1916). Heutige Kriterien zur Diagnostik wurden von Asbury und Cornblath zusammengefaßt (Asbury et al. 1990).

Die Krankheit beginnt oft mit Parästhesien an den Füßen oder auch den Fingern. Es folgt meist eine aufsteigende Schwäche der Beine bzw. der Arme (Ropper 1992). Bei schweren Verläufen kann es sowohl zu einer Schwäche der Gesichtsmuskulatur als auch der Mund- und Schlundmuskulatur kommen (Hughes 1990). Fulminante Verläufe mit Tetraplegie und beatmungspflichtiger respiratorischer Insuffizienz können auftreten (Löffel et al. 1977), sind aber intensivmedizinisch leichter beherrschbar als Störungen der autonomen Innervation, die die Patienten oft vital gefährden. Der typische Krankheitsverlauf ist monophasisch, wobei definitionsgemäß innerhalb von vier Wochen ein Höhepunkt erreicht wird und die Krankheitssymptome innerhalb von Wochen bis Monaten wieder abklingen. In 50-60% der Fälle bleiben neurologische Defizite zurück und die Letalität der Erkrankung beträgt zwischen 3 und 13% (The Guillain-Barré Syndrome Study Group 1985). Lungenembolien, cardiale Arrhythmien, Kreislaufversagen und komplizierende Sekundärinfektionen sind hierfür die häufigsten Ursachen.

Das GBS tritt mit einer Inzidenz von 1-2 Fällen pro 100.000 Einwohnern im Jahr auf und betrifft alle Altersklassen, wobei die Schwere der Krankheit mit steigendem Alter wächst (Sheth et al. 1996).

### **1.1.2 Pathologie**

In betroffenen peripheren Nerven und Spinalwurzeln wurden histologisch multifokale Entzündungsherde mit lymphozytärer Infiltration und eingewanderten Makrophagen nachgewiesen (Polyradikuloneuritis). Zusätzlich zeigt sich eine segmentale Demyelinisierung, wobei die Makrophagen die wesentlichen Effektorzellen der Demyelinisierung darstellen, da sie die Markscheiden durch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren oder durch Phagozytose attackieren (Asbury et al. 1969; Carpenter 1972; Hughes 1990; Prineas 1981).

### **1.1.3 Pathogenese**

Das GBS gilt als Prototyp einer immunvermittelten Neuropathie (Hartung und Toyka 1990). Die entzündlichen Infiltrate aus Lymphozyten und eingewanderten Makrophagen geben Hinweise auf eine zellvermittelte Immunpathogenese.

Für die pathogene Bedeutung humoraler Faktoren sind ebenfalls Hinweise vorhanden, zum Beispiel durch den Nachweis von Antikörpern gegen Myelinbestandteile, speziell Ganglioside (Koski et al. 1989; Ilyas et al. 1988; Enders et al. 1993), die Wirksamkeit der Plasmapherese-Behandlung und der intravenösen Gabe von hochdosiertem IgG (The Guillain-Barré Syndrome Study Group 1985; van der Meche et al. 1992), sowie dem Nachweis der Komplementaktivierung im Liquor und teils auch dem Plasma (Sanders et al. 1986; Koski et al. 1987).

Konzepte über das Zusammenspiel von zellulären und humoralen Immunreaktionen und ihrer verschiedenen Mediatoren bei der Entstehung des GBS sind in Bild 1.1 detailliert dargestellt.

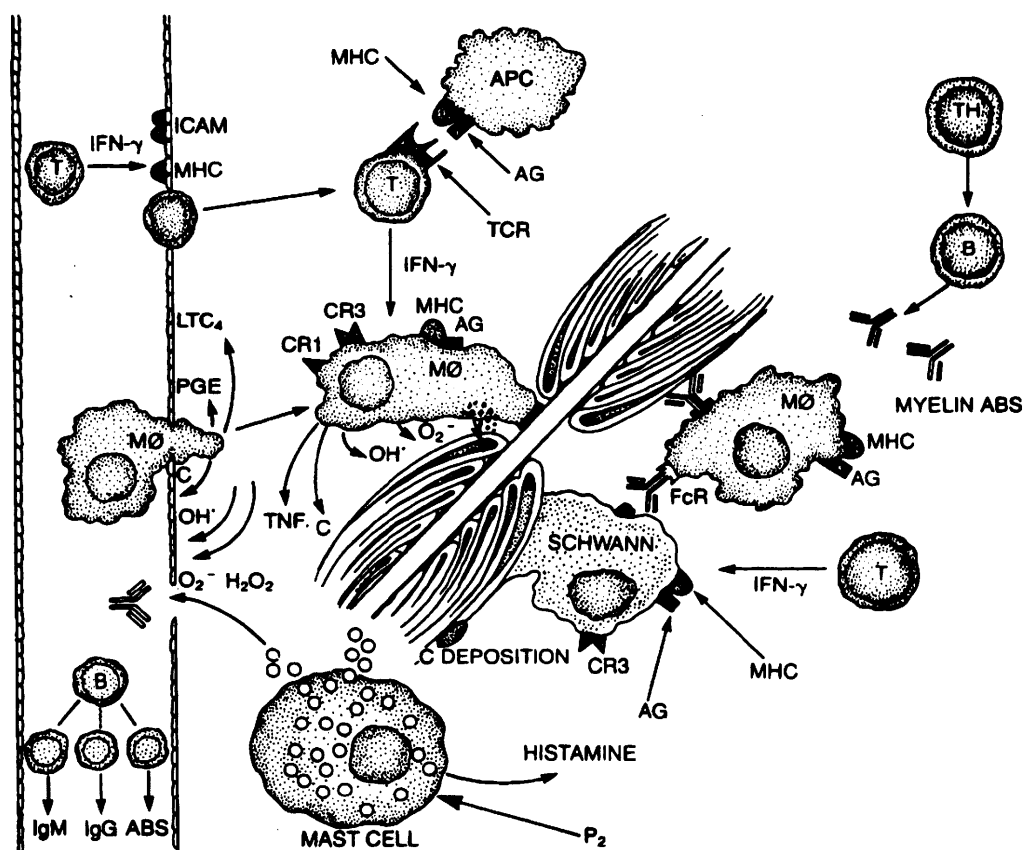


Bild 1.1: Übersicht der zellulären und humoralen Immunmechanismen der EAN und des GBS (aus Hartung et al. 1993)

Verwendete Abkürzungen: T = T-Zelle; APC = antigenpräsentierende Zelle; AG = Antigen; TCR = T-Zell-Rezeptor; MØ = Makrophage; IFN- $\gamma$  = Interferon  $\gamma$ ;  $O_2^-$  = Peroxidation;  $OH^*$  = Hydroxylradikal; PGE = Prostaglandin E; C = Komplementkomponente; CR3 = Komplementrezeptor 3; ABS = Antikörper; TNF = Tumornekrosefaktor

Virale und bakterielle Antigene können im Rahmen einer Infektion als Primärerkrankung potentiell autoreaktive T-Zellen aktivieren. Diese aktivierten T-Zellen sind in der Lage, durch die Blut-Nerv-Schranke in den peripheren Nerv zu gelangen. Dort kann es durch spezifisches Wiedererkennen autoantigener Epitope des peripheren Nervs in Verbindung mit den MHC-Klasse II-Antigenen auf antigenpräsentierenden Zellen zu einer Reaktivierung dieser T-Zellen kommen. Durch die reaktivierten T-Zellen kann eine inflammatorische Immunkaskade angestoßen werden, die zu einer Schädigung der Markscheiden der peripheren Nerven führt: Zunächst können die aktivierten T-Zellen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  freisetzen und dadurch Makrophagen aktivieren (Hartung et al. 1988c). Diese Makrophagen können die Myelinscheide direkt angreifen und das Myelin phagozytieren (Griffin et al. 1990) oder können durch die Freisetzung von Effektormolekülen wie Sauerstoffradikale, Peroxidationen,

Hydroxylradikale, Prostaglandin E, lytische Enzyme oder Komplementkomponenten strukturelle Schäden an Myelinscheide und / oder Axon verursachen. Zudem können die Makrophagen an myelinspezifische Antikörper über ihren Fc-Rezeptor binden und so an ihre spezifische Zielstruktur an der Myelinscheide geführt werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit der alleinigen Antikörperbindung an das Antigen, wodurch das klassische Komplementsystem aktiviert wird und die zerstörte Struktur direkt von den Makrophagen aufgenommen wird (Hartung et al. 1988b).

Weiterhin kann die Interaktion von T-Zellen mit den MHC-Molekülen der antigenpräsentierenden Zellen zu einer Proliferation von B-Zellen und dadurch zur Antikörperproduktion gegen Bestandteile des peripheren Nerven führen.

Auch Mastzellen können durch aktivierte T-Zellen degranuliert werden, wodurch permeabilitätssteigernde, vasoaktive Amine freigesetzt werden (Brosnan et al. 1984 und 1985). Zum Beispiel fördert freiwerdendes Histamin die Permeabilität der Gefäßendothelien. Diese vasoaktiven Substanzen aus den Mastzellen können zusammen mit den Effektormolekülen die Gefäßpermeabilität so weit steigern, dass die Blut-Nerv-Schranke geschädigt wird und neue Antikörper, Makrophagen und Entzündungsmediatoren in das Endoneurium eindringen können.

Eine Schädigung des Axons führt zu einem Ausfall der motorischen Einheit oder des sensiblen / vegetativen Impulses, eine Demyelinisierung bedingt eine Verringerung der Leitungsgeschwindigkeit oder einen Leitungsblock. Jeweils resultieren klinische Symptome wie Paresen, Taubheit oder autonome Dysregulation.

#### **1.1.4 Verschiedene Formen des GBS**

Epidemiologische Studien in der westlichen Welt, epidemiologische und histopathologische Studien bei chinesischen Patienten und Fallstudien besonders schwerer Fälle in der westlichen Welt lassen den Schluß zu, dass sich das GBS in verschiedenen Krankheitsmustern manifestieren kann. In der westlichen Welt ist eher die akute, entzündliche, demyelinisierende Polyradikuloneuritis (siehe 1.1.4.1) verbreitet, in Asien eher die Form der Erkrankung, bei der fast ausschließlich Axone motorischer Nerven geschädigt werden (siehe 1.1.4.2) (Jackson et al. 1993; Rees et al. 1995a). Eine Übersicht über die Diagnose und Klassifizierungskriterien wurde 2001 von einem Ausschuß von 20 Experten aufgestellt (Van der Meche et al. 2001).

#### **1.1.4.1 Acute Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy (AIDP)**

Physisch zeichnet sich AIDP durch Paralysen und Areflexien aus (Nachamkin et al. 1998). Elektrophysiologisch zeigt sich eine Demyelinisierung sowohl in motorischen als auch in sensiblen Nerven (Ho et al. 1995). Pathologisch zeigen sich intraneural durch Makrophagen hervorgerufene Demyelinisierungen und Infiltrate von Lymphozyten (Hartung et al. 1995a,b; Griffin et al. 1995). Im Serum von Patienten finden sich viele Marker für eine T-Zell-Aktivierung, so zum Beispiel löslicher IL2-Rezeptor und Interferon  $\gamma$  (Bansil et al. 1991).

Die histopathologische Ähnlichkeit der AIDP mit der experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN; siehe 1.2) läßt den Schluß zu, dass beiden zumindest teilweise gleiche pathogenetische Mechanismen zu Grunde liegen (Waksman und Adams 1955, 1956; Asbury et al. 1969). Der EAN wird ein T-Zell-vermittelter Mechanismus zugrunde gelegt, was bei der AIDP anhand von Autopsien und Biopsiebefunden nachvollzogen werden kann.

Die Wichtigkeit der durch Antikörper verursachten Nevenfaserschäden bei AIDP wird durch zahlreiche Beobachtungen nahegelegt: die Anwesenheit von anti-Myelin-Antikörpern (Koski et al. 1989, Korneberg et al. 1994) und der häufige Nachweis von anti-Glykokonjugat-Antikörpern (siehe 1.1.5). Weiterhin der Nachweis einer demyelinisierenden Aktivität von Faktoren im Serum von GBS-Patienten nach intraneuraler Injektion in Rattennerven (Sumner et al. 1982) oder der Nachweis einer neurotoxischen Aktivität von GBS-Serum bei *in vitro*-Inkubation mit Nerven- oder Schwannzellen (Koski et al. 1989; Sawant-Mane et al. 1991, 1994).

#### **1.1.4.2 Acute Motor Axonal Neuropathy (AMAN)**

Klinisch äußert sich AMAN durch Lähmungen oder Paralysen ohne Empfindungsverlust (Nachamkin et al. 1998). Auch elektrophysiologisch sind nur Axone motorischer Nerven betroffen (Griffin et al. 1996a). Elektrodiagnostische Befunde zeigen, dass motorische Fasern selektiv abnehmen können, während sensible Nervenfasern erhalten bleiben und keine Merkmale einer Demyelinisierung vorhanden sind (Ho et al. 1995). In der Pathologie zeigt sich, dass Infiltrationen durch Lymphozyten gewöhnlich nicht oder nur sehr spärlich vorkommen (Feasby et al. 1986; McKhann et al. 1993). Makrophagen werden oft adaxonal intakter Myelinscheiden in Kontakt mit dem Axon beobachtet (Griffin et al. 1996a; 1996b). Am Axon können

aktivierte Komplement-Komponenten festgestellt werden (Hafer-Macko et al. 1996). Dies legt die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern, die gegen axonale Antigene gerichtet sind, nahe (Hughes et al. 1999). Weiterhin tritt die AMAN-Form des GBS häufig nach vorhergehenden *Campylobacter jejuni*-Infektionen auf (Rees et al. 1995b, 1995c; Ho et al. 1995).

#### **1.1.4.3 Acute Motor and Sensory Axonal Neuropathy (AMSAN)**

Ausgeprägte und ausgedehnte Paralysen mit langsamer und meist unvollständiger Regeneration zeichnen die AMSAN-Form körperlich aus (Nachamkin et al. 1998, Ho et al. 1998). Elektrophysiologische Messungen zeigen zusätzlich eine Verminderung des sensorischen Aktionspotentials. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass die Krankheit auf einer *primär* axonalen Degeneration ohne vorherige Demyelinisierung beruht, und dass das Zielantigen auf dem Axon liegen könnte (Feasby et al. 1986).

Da auch durch schwere Formen einer AIDP mit *sekundärer* Axonläsion ähnliche elektrophysiologische und klinische Befunde erstellt werden können, ist eine Unterscheidung zwischen der AMSAN-Form und schweren Fällen der AIDP-Form des GBS nicht immer einfach (Berciano et al. 1993, 1997).

#### **1.1.4.4 Miller Fisher Syndrome (MFS)**

Physisch handelt es sich beim MFS um eine idiopathische Polyneuritis und Sonderform des GBS mit Ataxie, Areflexie und Ophthalmoplegie. Pathologische Befunde gehen von multifokalen Entzündungen aus, ähnlich denen bei AIDP (Hughes et al. 1999).

Im Serum von Patienten mit MFS finden sich sehr häufig Antikörper, die gegen das Gangliosid GQ1b reagieren (Chiba et al. 1992). Wichtig ist dabei auch, dass diese Antikörper sehr spezifisch für das MFS sind: sie werden im normalen Serum nicht gefunden (Hughes et al. 1999).

#### **1.1.5 Assoziation von Infektionskrankheiten mit dem GBS**

In  $\frac{2}{3}$  der Fälle von GBS tritt einige Tage oder Wochen zuvor eine Infektionserkrankung auf, die meist den oberen Respirationsbereich oder den Intestinaltrakt betroffen hat (Blaser et al. 1997). Hierbei ist besonders *C. jejuni* (Yuki et al. 1993) herauszustellen. Weiterhin wurden aber auch Zytomegalie-Viren (Boucquey et al. 1991), Epstein-Barr-Viren (Winer et al. 1988a) und jedoch weitaus seltener Mycoplasmen (Winer et al



1988a) nachgewiesen. Abhängig von den vorhergehenden Infektionskrankheiten werden unterschiedlich schwere Verläufe des GBS gesehen. So wurde 2001 von Hadden bestätigt (Hadden et al. 2001b), dass Patienten mit *C. jejuni*-Infektion mit höherer Wahrscheinlichkeit eine axonale Schädigung in der Neurophysiologie oder nicht reizbare Nerven entwickeln, als Patienten mit Zytomegalie-Viren oder nicht identifizierten Infektionen (Ho et al. 1999; Yuki et al. 1999). Weiterhin wird nachgewiesen, dass ein schweres Krankheitsbild oft mit einem serologischen Hinweis auf eine *C. jejuni*-Infektion, Diarrhoe, einem höheren Alter der Patienten und schwereren Lähmungen verbunden ist (Hadden et al. 2001b). Bei Patienten mit Zytomegalie-Viren ist es dagegen wahrscheinlicher, dass Moleküle, die mit der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Wanderung in Zusammenhang stehen, in erhöhten Konzentrationen gefunden werden (Hadden et al. 2001b).

Speziell für *C. jejuni* ist auch das gehäufte Auftreten bestimmter Serotypen in Verbindung mit dem GBS nachgewiesen; hier vor allem eine Assoziation mit dem Serotyp O:19, der bei Patienten mit Gastroenteritis kaum vorkommt. Übereinstimmende Beobachtungen machten Kuroki et al. 1993 (81% O:19 bei Isolaten aus GBS-Patienten), Fujimoto et al. 1992 (vier O:19-Isolate), Moran und O'Malley 1995 (Nachweis von O:19 bei GBS-Patienten in Irland) und Mishu et al. 1993 (33% O:19 bei GBS-Isolaten in USA). Außerdem wurde der Serotyp O:41 bei 6 von 9 GBS-Patienten in Südafrika isoliert, wurde jedoch sonst nur mit einer Häufigkeit von 12 aus 7119 in *C. jejuni*-Isolaten nachgewiesen (Lastovica et al. 1997). Weitere *C. jejuni*-Serotypen, die im Zusammenhang mit GBS identifiziert wurden, sind O:1, O:2, O:2/44, O:4, O:4/59, O:5, O:10, O:13, O:15, O:16, O:18, O:21, O:24, O:30, O:37, O:44 und O:64 (Übersicht in Prendergast und Moran 2000). In Zusammenhang mit dem MFS sind die *C. jejuni*-Serotypen O:2, O:10 und O:23 beschrieben (Yuki et al. 1994; Jacobs et al. 1995; Salloway et al. 1996).

#### **1.1.6 Hypothesen zur Entstehung des GBS als postinfektiöse Autoimmunerkrankung**

Sowohl der Nachweis von zellvermittelten und humoralen Immunreaktionen bei GBS-Patienten (siehe 1.1.2) als auch die Assoziation von Infektionskrankheiten mit dem GBS (siehe 1.1.5) führten zu der Annahme, dass eine gegen die peripheren Nerven gerichtete Immunreaktion durch vorangegangene bakterielle oder virale Infektionen induziert

wird. Es sind hierbei grundsätzlich zwei unterschiedliche Mechanismen denkbar: zum einen das molekulare Mimikry, zum anderen können durch die Infektion Störungen in der Regulation des Immunsystems hervorgerufen werden, die zu einer Aktivierung möglicher autoaggressiver Immunmechanismen führen (Übersicht siehe Bild 1.1).

Beim molekularen Mimikry kann die Ähnlichkeit der Struktur von Gangliosiden oder anderen Bestandteilen der Infektionserreger Kreuzreaktivitäten des Immunsystems gegen ein auf Erreger und Nerven ähnliches Epitop auslösen. Die Grundlagen für diese Hypothese bilden identische Kohlenhydratsequenzen der Lipopolysaccharide (LPS) von *C. jejuni*-Stämmen und der im Nervensystem vorhandenen Ganglioside, sowie das Vorhandensein von Antikörpern gegen Ganglioside (z.B. GM1; Yuki et al. 1996), vor allem auch in GBS-Patienten, die zuvor an einer *C. jejuni*-Infektion erkrankt waren (Koga et al. 1998a; Hadden et al. 2001b). So entsprechen auch die LPS der in dieser Arbeit eingesetzten *C. jejuni*-Stämme Strukturen verschiedener Ganglioside (Penner et al. 1997) (siehe auch Bild 1.2):

<i>C. jejuni</i> PG 836	Gangliosid GD3
<i>C. jejuni</i> OH 4382	Gangliosid GD3
<i>C. jejuni</i> OH 4384	Gangliosid GT1a

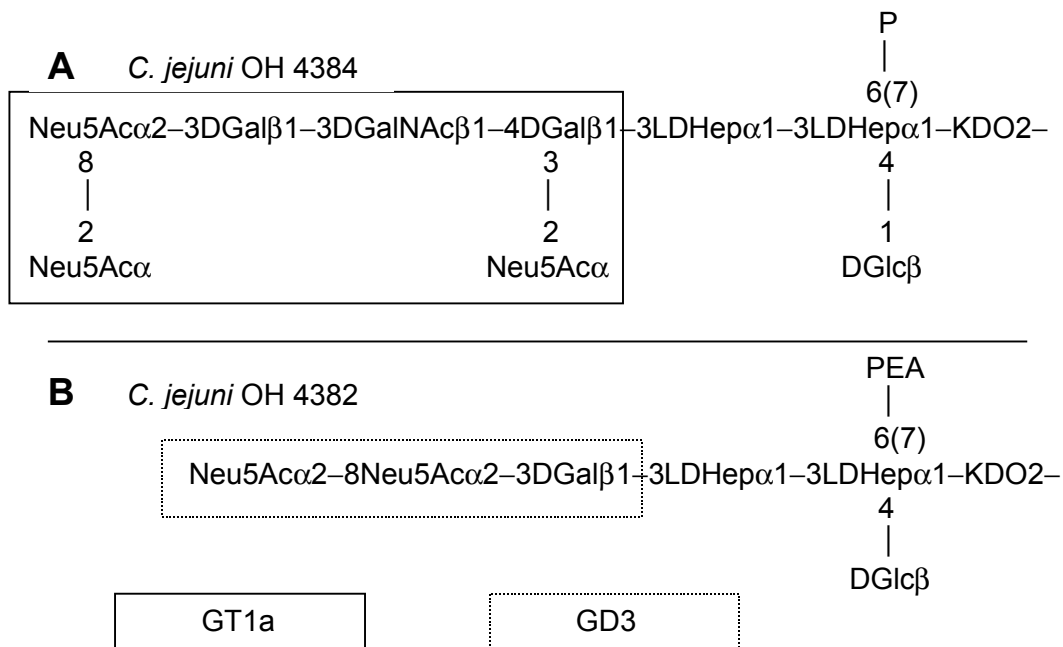


Bild 1.2: LPS outer core-Struktur von verwendeten *C. jejuni*-Stämmen und ihre Homologie zu den Gangliosiden GT1a und GD3: **A** OH 4384 **B** OH 4382 (aus Aspinall et al. 1994)  
verwendete Abkürzungen: Gal – Galactose; GalNAc – N-Acetylgalactosamin; Glc – Glucose; LDHep – L-Glycero-D-manno-heptose; KDO – 3-Deoxy-D-manno-octulosonic acid; Neu5Ac – N-Acetylneuraminsäure;

Studien von Yuki et al. 1993 und 1997b erhärten die Hypothese des molekularen Mimikry dadurch, dass eine Strukturgleichheit des LPS von *C. jejuni*-Stämmen, die von GBS-Patienten isoliert wurden, mit Gangliosiden bestätigt wurde.

Es ist einschränkend darauf hinzuweisen, dass trotz vieler Hinweise auf das molekulare Mimikry zusätzlich noch weitere Faktoren, wie die Eigenschaften des Patienten und der Bakterien, einen Einfluß auf das Vorkommen und den Verlauf der Krankheit haben. Diese Faktoren könnten bestimmen, ob sich nach einer *C. jejuni*-Infektion mit einem Stamm, dessen Struktur Ähnlichkeiten zu Gangliosiden aufweist, ein GBS entwickelt oder nicht (Moran et al. 2002).

## **1.2 Experimentelle autoimmune Neuritis (EAN)**

Das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN) wurde erstmals von Waksman 1955 im Kaninchen beschrieben (Waksman et al. 1955). Wie im Kaninchen kann die EAN als Tiermodell auch bei Ratten induziert werden. Da die EAN viele elektrophysiologische, immunologische und morphologische Charakteristika des GBS widerspiegelt, dient das Tiermodell zur Untersuchung von Krankheitsmechanismen beim GBS (Arnason und Soliven 1993).

Die EAN wird durch zahlreiche immunologische und morphologische Untersuchungen als akute, demyelinisierende, entzündliche Polyradikuloneuropathie charakterisiert (Lampert 1969; Hughes et al. 1981; King et al. 1983; Hughes 1990). Dabei entwickeln die Tiere eine monophasische Erkrankung, beginnend mit dem Verlust des Schwanztonus, Gangataxie und schließlich Paraparese bis hin zur Paraplegie der Hinterläufe, manchmal auch der Vorderläufe. Dies wird durch entzündliche Demyelinisierung von spinalen Nervenwurzeln und peripheren Nerven, bei schweren Verläufen auch durch axonale Schädigung, verursacht.

Ausgelöst werden kann die EAN entweder „aktiv“ durch Immunisierung mit peripherem Myelin (Smith et al. 1979; Hughes et al. 1981), den Myelinproteinen P2 (Olee et al. 1990) oder P0 (Linnington et al. 1992) oder einem, das neuritogene Epitop des P2 repräsentierenden Peptid (Olee et al. 1988; Powell et al. 1991; Rostami et al. 1990), oder „passiv“. Bei dieser als AT-EAN (Adoptive Transfer-EAN) bezeichneten Form wird die Erkrankung durch Injektion von T-Zellblasten aus spezifischen T-Zell-

Linien gegen P2, P2-Peptid, P0 oder P0-Peptid (Linnington et al. 1992; Powell et al. 1991; Hughes et al. 1981) induziert.

Die injizierten bzw. die durch Immunisierung entstandenen aktivierten, autoreaktiven T-Zellen durchdringen die Blut-Nerv-Schranke. Es wurde gezeigt, dass hierfür keine besondere Schädigung der Blut-Nerv-Schranke nötig ist, da aktivierte T-Zellen strukturell intakte Blut-Organ-Schranken durchqueren können, um Immunüberwachung auszuführen (Hickey et al. 1991). Nach Durchdringen der Blut-Nerv-Schranke befinden sich die CD4<sup>+</sup>-Zellen im PNS (Hahn et al. 1985) und interagieren dort mit antigen-präsentierenden Zellen, wobei v.a. Makrophagen (Schmidt et al. 1990), möglicherweise auch Schwann-Zellen (Pollard et al. 1987), eine Rolle spielen. Die Präsentation des Antigens in Assoziation mit MHC-Klasse II-Antigen führt zu einer T-Zell-Aktivierung und einer lokalen Produktion von Zytokinen (Hartung et al. 1993). Durch diese Immunaktivierung werden weitere entzündliche Prozesse ausgelöst, an denen Zytokine und, innerhalb und außerhalb der Blut-Nerv-Schranke, weitere Effektorzellen und viele Effektormoleküle beteiligt sind.

Histopathologisch zeichnet sich die EAN durch Infiltration des PNS durch Lymphozyten und Makrophagen aus (Izumo et al. 1985; Jung et al. 1993). Makrophagen sind als Effektorzellen für die Phagozytose des Myelins verantwortlich (Hahn et al. 1988; Ballin 1968; Lampert 1969).

Antikörper gegen Komponenten des peripheren Myelins lassen sich im Blut und Liquor von aktiv immunisierten, jedoch nicht AT-EAN-Tieren nachweisen (Archelos et al. 1993). Anders als wahrscheinlich beim GBS ist eine Kooperation von gegen Myelinkomponenten gerichteten Antikörpern mit autoreaktiven T-Lymphozyten nicht entscheidend für die volle Ausprägung der Krankheit (Hartung und Toyka 1990).

Ein weiteres Tiermodell für die axonale Form des GBS durch eine *C. jejuni*-Infektion wurde 1996 von Li et al. veröffentlicht. Dabei wurden Hühner mit *C. jejuni*-Bakterien gefüttert, die zuvor von einem GBS-Patienten isoliert worden waren. Bei den Hühnern traten spontan Paralysen auf und die Pathologie des Ischiasnervs zeigte Symptome von „kein Befund“ bis zu schweren Wallerschen Degenerationen. Allerdings konnte dieses Versuchsergebnis von keiner anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden.

---

## 1.3 *Campylobacter jejuni*

### 1.3.1 Geschichte und Bedeutung

Zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurden die heute als *Campylobacter* bekannten Stämme erstmals beschrieben (McFadyean und Stockman 1913). Erst im Jahr 1972 konnte von Dekeyser aus dem Stuhl von Patienten mit Diarrhoe der Infektionserreger isoliert werden (Dekeyser et al. 1972), obwohl seine Anwesenheit im Darm schon früher vermutet wurde (King 1957).

Heute gilt *C. jejuni* als einer der häufigsten Erreger für Gastroenteritis weltweit (Allos 2001).

### 1.3.2 Biologie

*Campylobacter jejuni* sind gramnegative, spiralig geformte, dünne Stäbchen mit spitzen Enden, von denen entweder eines oder beide begeißelt sind. Sie wachsen unter mikroaerophilen Bedingungen bei einer Sauerstoffkonzentration von 3-15% und einer Kohlenstoffdioxidkonzentration von 3-5%. Ihr Temperaturoptimum besitzen sie bei 42 °C.

### 1.3.3 Epidemiologie und Übertragung

*Campylobacter*-Infektionen sind weltweit als Zoonosen verbreitet. Dabei wird der Erreger leicht von infizierten Haustieren auf den Menschen übertragen, wobei die Übertragung von *C. jejuni*-Organismen meistens fäkal-oral oder auch über kontaminierte Nahrung und kontaminiertes Trinkwasser erfolgt. Hier sind vor allem unbehandelte Milch und durch Fäkalien verunreinigtes Trinkwasser sowie Fleisch, v.a. von Geflügel, dessen Oberfläche beim Schlachten mit Fäkalien verunreinigt wurde, zu nennen. Die Infektionsdosis variiert zwischen 5 und 800 aufgenommenen Organismen. Dabei korreliert die Anfälligkeit mit der Höhe der aufgenommenen Dosis (Black et al. 1988).

*C. jejuni* kommt als Kommensale im Gastrointestinaltrakt von Haus- und Wildtieren vor und kann auch bei Rindern, Schafen, Schweinen und Vögeln eine Gastroenteritis auslösen (Hahn et al. 2001).

#### 1.3.4 Klinik

Das klinische Spektrum von enteritischen Erkrankungen, die durch *C. jejuni* ausgelöst werden können, reicht von einer starken, entzündlichen Diarrhoe bis zu einer gewöhnlich milden, nicht entzündlichen, wässrigen Diarrhoe (zusammengefasst von Walker et al. 1986). Dabei tritt die entzündliche Diarrhoe meistens bei Patienten in Industrienationen auf, wohingegen die wässrige Diarrhoe am häufigsten in Entwicklungsländern beobachtet wird (Ketley 1997; Walker et al. 1986).

Nachdem *C. jejuni* oral aufgenommen wurde, verläuft die Erkrankung ein bis zwei Tage in einer unspezifischen Prodromalphase und danach als akute Enteritis, die einen bis sieben Tage anhalten kann (Hahn et al. 2001).

Bei *Campylobacter*-Infektionen tritt eine hohe Spontanheilungsrate auf. Dagegen kommt es aber auch bei 10-20% der Patienten zu verlängerten Krankheitsverläufen und in ca. 5-10% kommt es zu Rückfällen. Treten die *C. jejuni*-Organismen in den Blutkreislauf ein, können sie septisch wirken (Hahn et al. 2001).

#### 1.3.5 Pathogenese

Der molekulare Mechanismus, der der Pathogenese von *C. jejuni*-Erkrankungen zugrunde liegt, ist nicht bekannt.

In Verbindung mit der Nahrung wird *C. jejuni* aufgenommen und passiert den Magen, danach vermehrt er sich in der Gallenflüssigkeit und im oberen Dünndarm. Dabei adhärirt *C. jejuni* an der Oberfläche von Epithelzellen und besiedelt so den Darm. Dort stören die Organismen die Absorption durch den Darm entweder direkt durch Zellinvasion und Toxinbildung oder indirekt durch das Auslösen einer entzündlichen Immunantwort. Da sich diese Mechanismen gegenseitig nicht ausschließen, kann abhängig vom gesundheitlichen Zustand des Patienten und von den Eigenschaften des infizierenden *C. jejuni*-Stammes, jede mögliche Kombination vorkommen (Ketley 1997).

#### 1.3.6 Serotypen

Die Einteilung der *C. jejuni*-Stämme kann nach verschiedenen Merkmalen erfolgen. Zum einen über eine Agglutinationstechnik, die auf hitzelabilen Antigenen, also Proteinen, basiert und 1982 von Lior beschrieben wurde (Lior et al. 1982). Zum anderen

---

aufgrund von hitzestabilen Antigenen, den Lipopolysacchariden (Penner und Hennessy 1980).

*C. jejuni*-Stämme, die nach dem Ausbruch einer GBS-Erkrankung isoliert werden konnten, wurden typisiert und in verschiedenen Studien stellten sich verschiedene Stämme als besonders dominant heraus: Penner 19 (Kuroki et al. 1993, Hughes und Rees 1997), Penner 41 (Lastovica et al. 1997), Lior 7 (Yuki et al 1997a) und Lior 11 (Enders et al 1993)(siehe auch 1.1.5).

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Das gehäufte Auftreten des GBS nach einer Enteritis durch *C. jejuni* und der Nachweis einer Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen Ganglioside, die im peripheren Nervensystem exprimiert werden, mit Glykolipiden aus *C. jejuni*, lassen auf eine mögliche pathogene Bedeutung einer *C. jejuni*-spezifischen Immunantwort bei der Entstehung des GBS schließen.

Die funktionelle Relevanz der *C. jejuni*-spezifischen Immunantwort sollte im Rahmen dieser Arbeit auf unterschiedlichsten Wegen untersucht werden. Zum einen sollte im Tiermodell der EAN und der AT-EAN die Neuritogenität von verschiedenen *C. jejuni*-Präparationen durch Immunisierung von Ratten untersucht werden. Weiterhin galt es, den Einfluß von enteralem *C. jejuni*-LPS auf die orale Induktion einer antigenspezifischen Immuntoleranz zu prüfen, da das *C. jejuni*-LPS während einer Enteritis im Darm präsent ist. Es sollte aber auch untersucht werden, ob orale Toleranz durch *C. jejuni*-Antigene induziert werden kann oder, ob umgekehrt die Immunantwort auf eine Immunisierung mit BPM durch vorherige enterale Gabe von *C. jejuni*-Antigenen verstärkt werden kann.

Die pathogenetische Bedeutung von *C. jejuni*-spezifischen Antikörpern sollte im Modell der EAN, sowie auch *in vitro* in Makro-Patch-Clamp-Untersuchungen an der neuromuskulären Endplatte des Mäusezwerchfells analysiert werden.

Auf zellulärer Ebene stellte sich die Aufgabe, sowohl *C. jejuni*-spezifische Ratten- als auch *C. jejuni*-spezifische humane T-Zell-Linien zu generieren. In beiden Systemen sollte der Phänotyp der Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt werden. Jeweils war eine Kreuzreaktivität mit Bestandteilen des peripheren Nervensystems und bei Ratten

das neurotogene Potential der *C. jejuni*-spezifischen T-Zellen mittels adoptivem Transfer in naive Empfängertiere zu überprüfen.

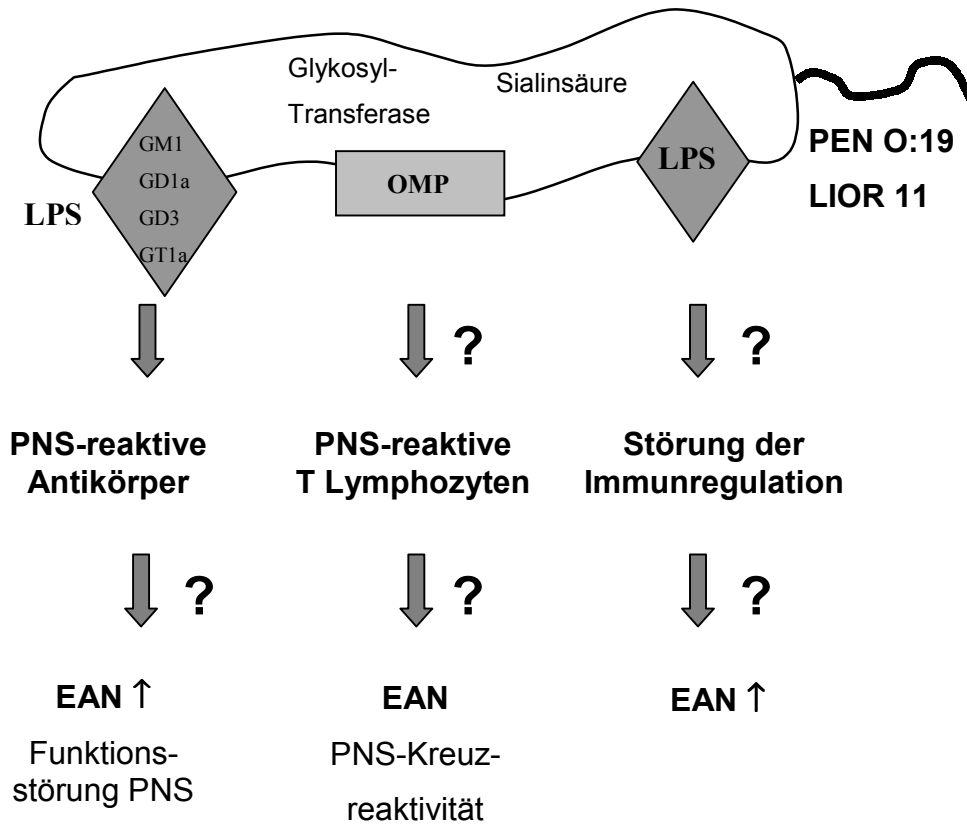


Bild 1.3: Übersicht über die Ziele der Arbeit.

Über *C. jejuni*-Antigene (LPS, Proteine und Gesamt-*C. jejuni*) hauptsächlich der Stämme O:19 und Lior 11 wird versucht, eine Autoimmunität nachzuweisen; vor allem durch die Generierung PNS-reaktiver T-Lymphozyten, die Generierung PNS-reaktiver Antikörper und eine mögliche Störung der Immunregulation, primär durch *C. jejuni*-LPS.



## **2 Ergebnisse**

### **2.1 Evaluation der Neuritogenität von *C. jejuni*-Antigenpräparationen in Ratten**

Zur Klärung der Frage, inwieweit *C. jejuni*-Antigenpräparationen bei Ratten neuritogen sein können, wurden Lewis- und DA-Ratten mit Gesamt-*C. jejuni* (Bakteriengesamthomogenat, siehe 4.4.1), *C. jejuni*-Protein (siehe 4.4.2 bzw. 4.4.3) bzw. *C. jejuni*-LPS (siehe 4.4.4 bzw. 4.4.5) und entsprechenden Kontrollantigenen immunisiert.

#### **2.1.1 Immunisierung mit Gesamt-*C. jejuni* und Kontrollantigenen**

Die Induktion einer EAN erfolgte durch Immunisierung mit Natriumazid-sterilisierten Gesamt-*C. jejuni*-Präparationen (siehe 4.4.1). Dazu wurden je sieben Lewis-Ratten pro Gruppe mit je 1 mg Gesamt-*C. jejuni*/CFA subkutan in die hinteren Fußsohlen und in den unteren Rückenbereich immunisiert. Als Kontrollen wurden Tiere mit 4 mg BSA/CFA, 1 mg *Salmonella typhimurium*/CFA oder 1 mg gemischter Ganglioside/CFA genauso immunisiert.

21 Tage nach der ersten Immunisierung zeigten sich keine äußeren Krankheitszeichen einer EAN. Deswegen wurden die Tiere erneut mit jeweils 1 mg Gesamt-*C. jejuni*/IFA subkutan geboostert. Die Kontrolltiere wurden gleichermaßen mit 4 mg BSA/IFA, 1 mg *Salmonella typhimurium*/IFA oder 1 mg Ganglioside/IFA geboostert. Keines der Tiere entwickelte bis zum Ende der Beobachtung Krankheitszeichen.

Zum Vergleich ist in Bild 2.1 der Verlauf einer BPM-induzierten EAN in Lewis-Ratten dargestellt.

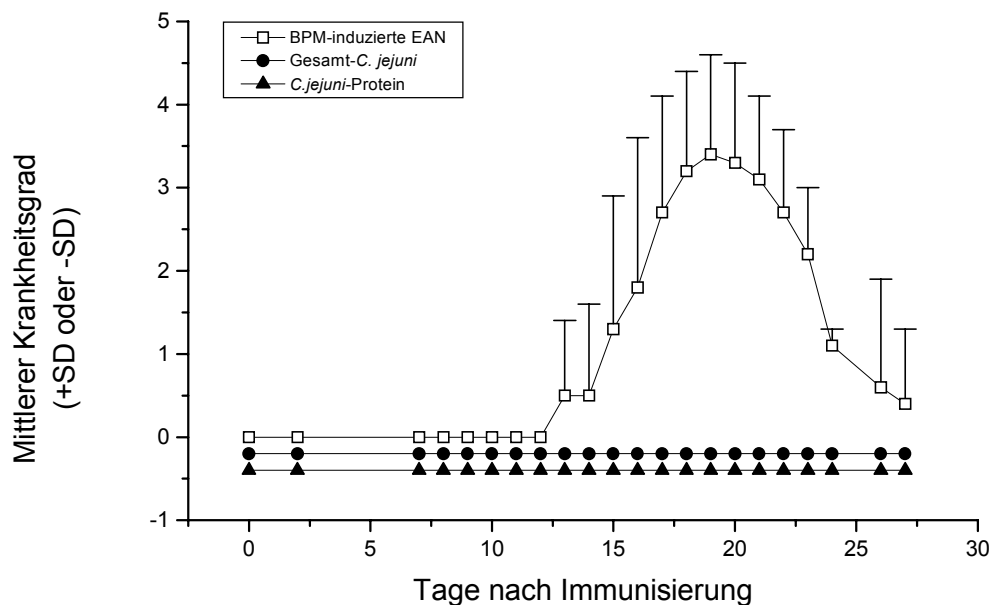


Bild 2.1: Verlauf einer BPM-induzierten EAN und Vergleich zu den eingesetzten *C. jejuni*-Antigenen. Jeweils sieben Tiere pro Gruppe wurden mit 3,75 mg BPM/Tier in CFA bzw. mit 1 mg Gesamt-*C. jejuni*/CFA oder 250  $\mu$ g *C. jejuni*-Protein/CFA subkutan in die hintere Fußsohle immunisiert und anhand der klinischen Krankheitszeichen beurteilt.

### 2.1.2 Proteinfraktionen von *C. jejuni* 5646 und 5647

In Kenntnis, dass stark immunogene, nicht neuritogene Antigene eine möglicherweise neuritogene Immunantwort gegen schwache Immunogene unterdrücken können, wurde mit unterschiedlichen Protein-Fraktionen der *C. jejuni*-Stämme 5646 und 5647 immunisiert (siehe 4.4.3). Dazu wurden die OMP-Präparationen über 12,5%ige SDS-Gele aufgetrennt, die Gele zerschnitten, die Proteinfraktionen durch Elektroelution wieder aus dem Gel eluiert und gleichzeitig aufkonzentriert. Von diesen Proteinlösungen wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt und dann je drei Lewis-Ratten pro Gruppe mit jeweils 250  $\mu$ g/CFA immunisiert.

14 Tage nach Immunisierung mit den Proteinfraktionen zeigten sich keine Krankheitszeichen einer EAN. Es wurde je ein Tier pro Gruppe für Zellansätze getötet und die übrigen Tiere noch bis Tag 32 nach Immunisierung beobachtet. Auch diese Tiere zeigten keine Krankheitszeichen einer EAN (Bild 2.1).

### **2.1.3 Immunisierung von DA-Ratten mit Gesamt-*C. jejuni***

Um eine mögliche Induktion der EAN durch Gesamt-*C. jejuni* auch in anderen Rattenstämmen zu testen, wurden Dark agouti (DA)-Ratten (vier Tiere pro Gruppe) mit jeweils 1 mg Gesamt-*C. jejuni*/CFA von *C. jejuni* 5646 und 5647 subkutan in die hinteren Fußsohlen und in den unteren Rückenbereich immunisiert. Als Kontrollantigen wurde mit jeweils 1 mg *Salmonella typhimurium*/CFA immunisiert.

Nach 32 Tagen Beobachtung zeigten sich weder bei den *C. jejuni*-immunisierten noch bei den mit *Salmonella typhimurium* immunisierten Tieren Krankheitszeichen einer EAN (ohne Bild).

## **2.2 Mögliche Beeinflussung einer AT-EAN durch vorherige Induktion einer Immunreaktion gegen *C. jejuni***

Da durch Immunisierung mit *C. jejuni*-Antigenpräparationen keine EAN ausgelöst werden konnte, stellt sich die Frage, ob, bei mit *C. jejuni*-Antigenpräparationen vorimmunisierten Tieren, durch neuritogene P2-spezifische T-Lymphozyten, die eine adoptiv-transferierte EAN (AT-EAN) auslösen und die Blut-Nerv-Schranke öffnen, die Krankheitszeichen verstärkt werden.

### **2.2.1 Gesamt-*C. jejuni***

Die Tiere wurden mit Gesamt-*C. jejuni* in CFA immunisiert und nach 3 Wochen nochmals mit Gesamt-*C. jejuni* in IFA geboostert. Als Kontrollantigen wurde mit der gleiche Menge an *Salmonella typhimurium* immunisiert. Wie bei den Versuchen zuvor (Bild 2.1) entwickelten die Tiere keine Krankheitszeichen. Nach einer weiteren Woche wurden zur Induktion einer AT-EAN 10 Mio. P2-Zellen/Tier intravenös verabreicht.

Sowohl die Kontrollgruppe als auch die mit Gesamt-*C. jejuni* immunisierten Tiere zeigten ab Tag 4 nach P2-Zelltransfer Lähmungserscheinungen einer Neuritis (Bild 2.1). An Tag 6 erreichten alle drei Gruppen den schwersten Grad der Erkrankung, wobei die Tiere mittelschwere Paraparesen zeigten. Ab Tag 10 nach dem Zelltransfer erholten sich die Tiere bis zum Tag 17 wieder vollständig.

Die Veränderungen im Körpergewicht zeigten einen entgegengesetzten Verlauf. In allen drei Gruppen nahm das Gewicht im Verlauf der Erkrankung um ca. 30 Gramm ab und ab Tag 10 nach dem Zelltransfer nahmen die Tiere kontinuierlich wieder zu.

Zwischen den mit *C. jejuni*-immunisierten Tieren und den mit *Salmonella*-immunisierten Tieren zeigte sich kein Unterschied im Krankheitsverlauf.

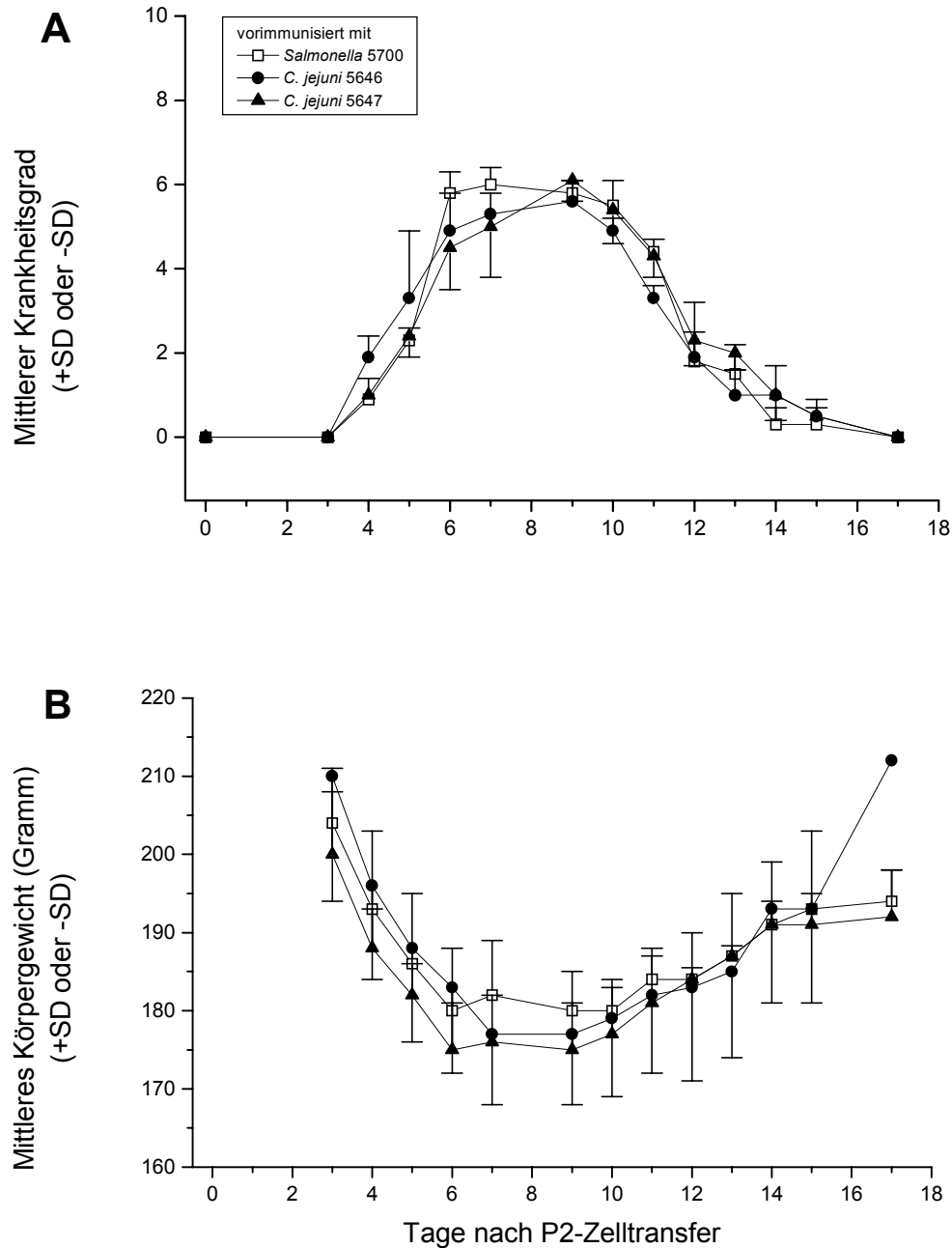


Bild 2.1: AT-EAN durch Transfer von P2-Zellen nach vorheriger Immunisierung mit Gesamt-*C. jejuni* bzw. *Salmonella typhimurium*.

Vier Lewis Ratten pro Gruppe wurden mit 1 mg *Salmonella typhimurium*/CFA als Kontrollgruppe, bzw. 1 mg *C. jejuni* 5646/CFA oder 5647/CFA subkutan immunisiert. Nach 21 Tagen wurden die Tiere mit der gleichen Menge Antigen in IFA, ebenfalls subkutan, geboostert. Eine Woche nach dem Boostern wurden pro Tier 10 Mio. P2-Zellen zur Induktion der AT-EAN intravenös gespritzt. Die Tiere wurden nach klinischen Krankheitszeichen beurteilt (A) und täglich gewogen (B).

### 2.2.2 *C. jejuni*-LPS

Immunisierungen mit Gesamt-*C. jejuni*, in dem Proteine und LPS vorhanden sind, zeigten bei der Vorbehandlung keinen Einfluß auf den Verlauf einer nachfolgend induzierten AT-EAN (siehe 2.2.1). Allerdings stellt sich die Frage, ob durch Verwendung von *C. jejuni*-LPS, andere Ergebnisse erzielt werden können, denn PNS-Gangliosid-reaktive Antikörper können im Tierexperiment durch *C. jejuni*-LPS-Immunisierungen induziert werden, da LPS von *C. jejuni* GM1-Epitope enthält, gegen die sich auch Antikörper bei GBS-Patienten finden.

Wie im Versuch zuvor wurden die Tiere vier Wochen vor Induktion einer AT-EAN mit *C. jejuni*-LPS in CFA immunisiert und eine Woche vor Gabe der P2-Zellen nochmals mit *C. jejuni*-LPS in IFA geboostert. Als Kontrollantigen wurde die gleiche Menge an *E. coli*-LPS eingesetzt. Um einer Arthritis vorzubeugen, wurde der Glykolipid-suspension BSA zugefügt.

Zwischen Tag 3 und Tag 6 nach P2-Zelltransfer erkrankten alle drei Gruppen bis zu einem Krankheitsgrad von 6 bis 7, wobei die Tiere mittelschwere bis schwere Paraparesen zeigten. Die Kontrollgruppe erholte sich schon ab Tag 7 und war an Tag 17 nach Zelltransfer wieder vollständig erholt. Die mit *C. jejuni*-LPS behandelten Tiere dagegen erholten sich deutlich schlechter und zeigten auch an Tag 17 nach dem Zelltransfer noch Ataxien und abnormale Haltungsreflexe (Bild 2.1).

Während Kontrolltiere und *C. jejuni* 5647 LPS-vorimmunisierte Tiere am Ende der Behandlungszeit ihr Ausgangsgewicht nahezu wieder erreicht hatten, gewannen *C. jejuni* 5646 LPS-sensitivierete Ratten bei persistierenden Krankheitszeichen im Rahmen der Erholung deutlich weniger Gewicht hinzu und lagen noch ca. 10 Gramm unter dem Ausgangsgewicht. Die starken Gewichtsunterschiede von schon 30 Gramm beim Ausgangsgewicht, aber auch die verzögerte Erholung eines Teiles der *C. jejuni*-immunisierten Tiere, waren durch die Inhomogenität der Gruppen begründet. Es mußten für die beiden *C. jejuni*-LPS-Gruppen Tiere nachgekauft werden und gerade diese leichteren Tiere erkrankten schwerer und länger.

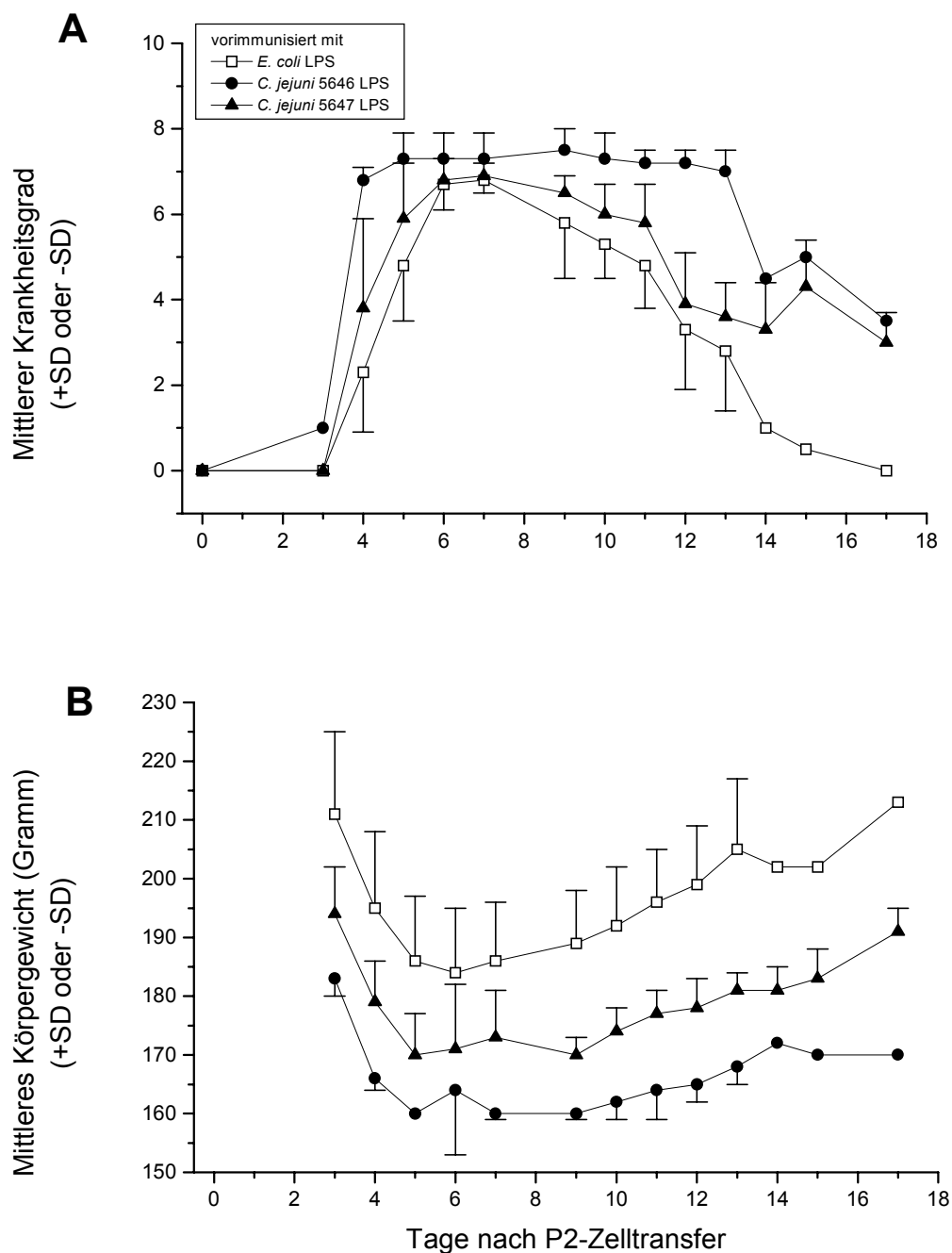
Aufgrund dessen wurde der Versuch nochmals durchgeführt (Bild 2.2). Diesmal jedoch mit Inkomplettem Freund'schem Adjuvans (IFA), da vielleicht auch die Verwendung von CFA zur stärkeren Erkrankung geführt hat. Außerdem wurden statt einer Menge

von 10 Mio. P2-Zellen im ersten Versuch nur noch 8 Mio. P2-Zellen gespritzt, um eine nicht so starke AT-EAN auszulösen.

Zwischen Tag 3 und Tag 6 nach P2-Zelltransfer erkrankten die Tiere beider Gruppen. Im Vergleich zum vorherigen Versuch zeigten sich keine Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und *C. jejuni*-LPS-immunisierten Tieren. Beide Gruppen erreichten ein Krankheitsmaximum mit nur leichten Schwanzlähmungen an Tag 6 nach Zelltransfer, also nur drei Tage nach dem Krankheitsbeginn. Bereits am elften Tag nach dem Zelltransfer zeigten beide Gruppen keine Krankheitszeichen mehr (Bild 2.2 A).

Der Kurvenverlauf des Körpergewichts gibt ebenfalls den leichten Krankheitsverlauf wieder. Es zeigt sich sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der *C. jejuni*-LPS-immunisierten Gruppe nur ein leichter Gewichtsrückgang an Tag 5. Ansonsten verlief die Gewichtszunahme während des Versuchverlaufs stetig ansteigend (Bild 2.2 B).

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Verschlechterung des Krankheitsverlaufs im ersten Versuch mit den unterschiedlichen Tieren zusammenhängt, da das Ergebnis des Versuchs nicht reproduzierbar war.



*Bild 2.1: Modulation einer AT-EAN durch vorherige Immunisierung mit C. jejuni-LPS. Vier Lewis Ratten pro Gruppe wurden mit 1 mg E. coli-LPS/CFA als Kontrollgruppe, bzw. 1 mg C. jejuni-LPS 5646/CFA oder 5647/CFA s. c. immunisiert. Nach 21 Tagen wurden die Tiere mit der gleichen Menge Antigen in IFA, ebenfalls s.c., geboostert. Eine Woche nach dem Boostern wurden pro Tier 10 Mio. P2.37-Zellen zur Induktion der AT-EAN i. v. gespritzt. Die Tiere wurden nach klinischen Krankheitszeichen beurteilt (A) und täglich gewogen (B).*

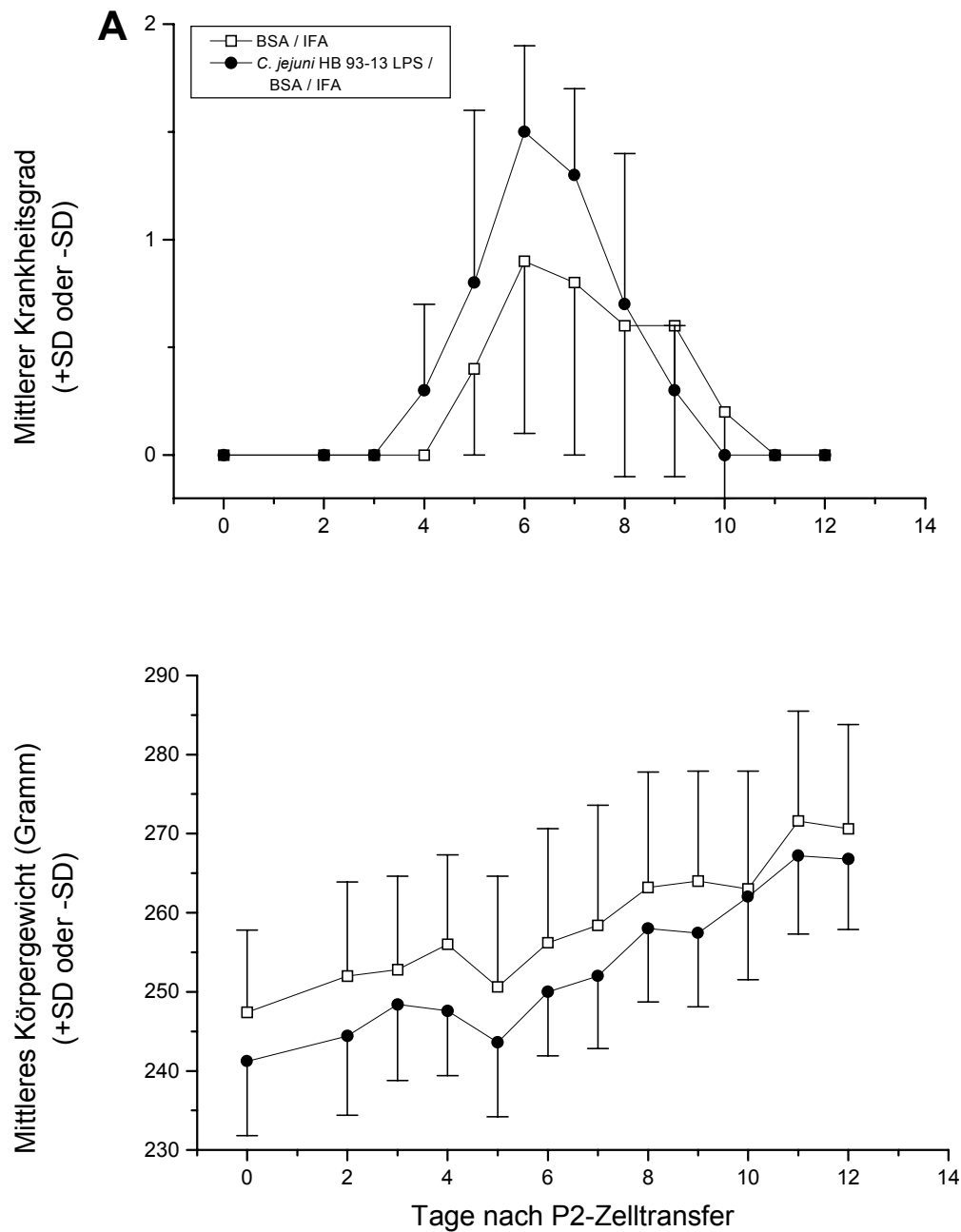


Bild 2.2: Zweiter Versuch zur Modulation einer AT-EAN durch vorherige Immunisierung mit *C. jejuni*-LPS.

Fünf Lewis Ratten pro Gruppe wurden mit 4 mg BSA/IFA als Kontrollgruppe, bzw. 1 mg *C. jejuni*-LPS HB 93-13 zusammen mit 4 mg BSA/IFA s. c. immunisiert. Nach 17 Tagen wurden die Tiere mit der gleichen Menge Antigen/IFA, ebenfalls s. c., geboostert. Acht Tage nach dem Boostern wurden pro Tier 8 Mio. P2.37-Zellen zur Induktion der AT-EAN i. v. gespritzt. Die Tiere wurden nach klinischen Krankheitszeichen beurteilt (A) und täglich gewogen (B).



### 2.2.3 Serologische Untersuchungen

Auch wenn im klinischen Verlauf bei den mit *C. jejuni*- und *C. jejuni*-LPS-vorimmunisierten Tieren die klinischen Anzeichen nicht verstärkt auftraten, wurden in den Tieren doch ausreichend gewünschte Antikörper gegen *C. jejuni* gebildet (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Antikörpertiter gegen *C. jejuni* 5646 und *C. jejuni* 5647.  
Untersucht wurden die Seren der Tiere 301, 302, 304-318 und 325-330 nach der ELISA Methode aus Kapitel 4.8, wobei das Serum entweder an Tag 48 oder Tag 52 nach der Immunisierung mit BPM entnommen wurde.

vorimmunisiert mit	Tier-Nummer	Serum entnommen an Tag	Titer bei Beschichtung mit Gesamt-C.j. 5646	Titer bei Beschichtung mit Gesamt-C.j. 5647
<i>E. coli</i> LPS	301	48	128	64
	302	48	32	0
	304	52	0	0
<i>C. jejuni</i> 5646	305	48	4096	4096
	306	48	16384	8192
	307	52	32768	16384
	308	52	8192	8192
<i>Salmonella typhimurium</i>	309	52	64	32
	310	48	128	64
	311	52	128	64
	312	48	32	32
<i>C. jejuni</i> 5647	313	52	2048	1024
	314	52	2048	4096
	315	52	2048	4096
	316	52	1024	1024
<i>C. jejuni</i> 5647 LPS	317	48	1024	256
	318	52	2048	512
	325	48	256	256
	326	52	256	128
<i>C. jejuni</i> 5646 LPS	327	48	64	32
	329	48	512	512
	330	52	128	256

## **2.3 Einfluß von *C. jejuni*-LPS auf die orale Induktion einer antigenspezifischen Immuntoleranz durch Fütterung von bovinem Myelin**

### **2.3.1 Klinischer Verlauf**

Die orale Toleranz ist eine durch ein oral verabreichtes Protein spezifische immunologische Hyporeaktivität des Organismus und wahrscheinlich ein bedeutender Mechanismus beim Erhalt der Immunhomöostase. Da bei einer *C. jejuni*-Enteritis LPS im Darm präsent ist und LPS ein starker Immunaktivator ist, stellt sich die Frage, ob im Versuch *C. jejuni*-LPS einen Einfluß auf die orale Induktion einer antigenspezifischen Immuntoleranz hat.

Zur Untersuchung des Einflusses von *C. jejuni*-LPS bei der Induktion von oraler Toleranz durch bovines Myelin wurden Lewis Ratten fünfmal innerhalb von zehn Tagen mit Puffer, Myelin, Myelin und *C. jejuni*-LPS oder nur *C. jejuni*-LPS gefüttert. Einen Tag nach der letzten oralen Applikation wurde durch subkutane Immunisierung mit BPM in CFA eine aktive EAN ausgelöst. Dieses Experiment wurde wiederholt durchgeführt und zeigte immer ähnliche Ergebnisse.

Bei den Kontrollratten, die mit Puffer gefüttert worden waren, traten die ersten Krankheitszeichen in Form einer Lähmung der Schwanzspitze (Grad 1) zwischen dem 12. und 13. Tag nach der Immunisierung auf (Bild 2.1 A). Innerhalb der folgenden Tage entwickelten sie eine Schwanzlähmung und Ataxie (Grad 2 bis 3). Diese Tiere erholten sich nicht bis zum Ende des Beobachtungszeitraums 23 Tage nach der Immunisierung sondern zeigten eher noch eine schwache Zunahme der Symptome.

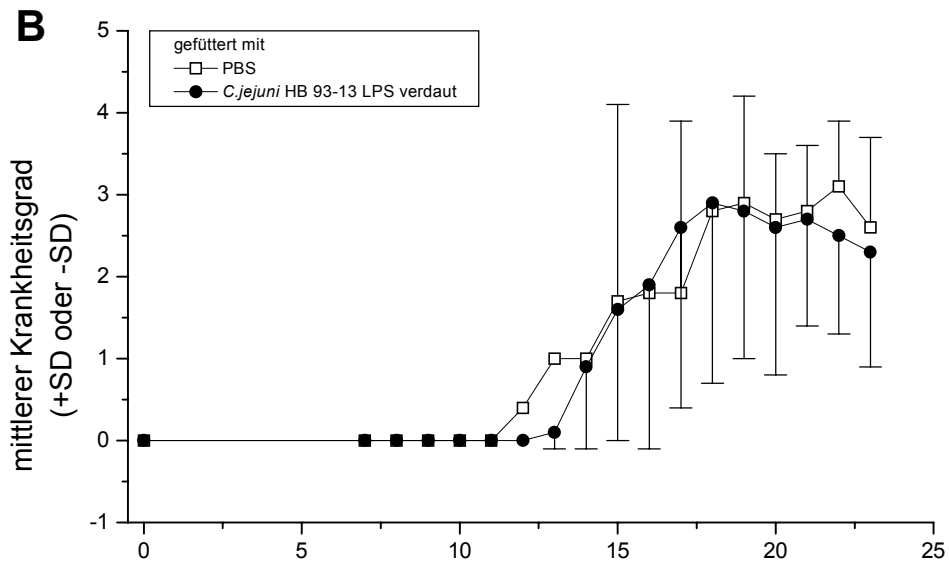
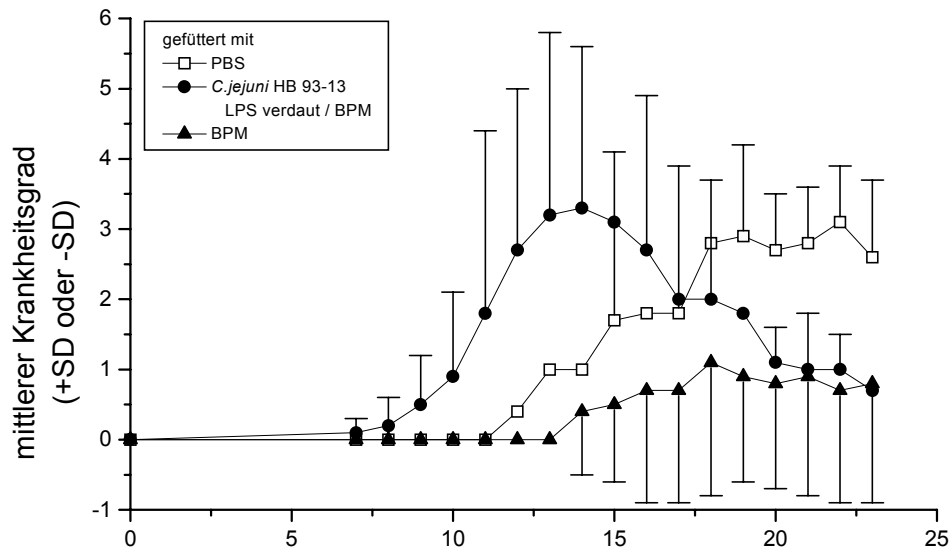
Diejenigen Ratten, die nur mit Myelin gefüttert worden waren, konnten vor deutlichen Krankheitszeichen der EAN bewahrt werden und zeigten keine Beeinträchtigung in der Fortbewegung, sondern lediglich eine Schwanzlähmung (Grad 2), die auch erst am 14. Tag nach der Immunisierung auftrat. Somit wiesen sie ab dem 13. Tag nach der Immunisierung einen signifikant geringeren klinischen Krankheitsgrad als die Puffergefütterten Kontrolltiere auf.

Wurden die Tiere hingegen mit BPM zusammen mit *C. jejuni*-LPS gefüttert, so führte dies im Vergleich zu den PBS-gefütterten Kontrollen zu einem deutlich früheren Ausbruch der Krankheit. So erkrankten die Tiere bereits am 7. Tag nach der

Immunisierung und erreichten nach 13 Tagen schon einen Höhepunkt mit Ataxie (Grad 3 bis 4). Im Vergleich mit den Kontrolltieren zeigten sie jedoch bereits nach sieben Tagen eine Verbesserung und erholten sich bis zum Ende des Beobachtungszeitraums am 23. Tag nach der Immunisierung bis auf einen reduzierten Schwanztonus fast vollständig.

Diejenigen Tiere, die mit *C. jejuni*-LPS alleine gefüttert wurden, zeigten im Vergleich zu den Puffer-gefütterten Tieren keinen andersartigen Krankheitsverlauf (Bild 2.1 B).

Typischerweise korrelierte das Körpergewicht invers mit dem Schweregrad der Krankheit (Bild 2.1 C). Diejenigen Tiere, die mit Myelin alleine gefüttert worden waren und nur geringe klinische Symptome aufwiesen, zeigten im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen keine Stagnation ihrer Gewichtszunahme.



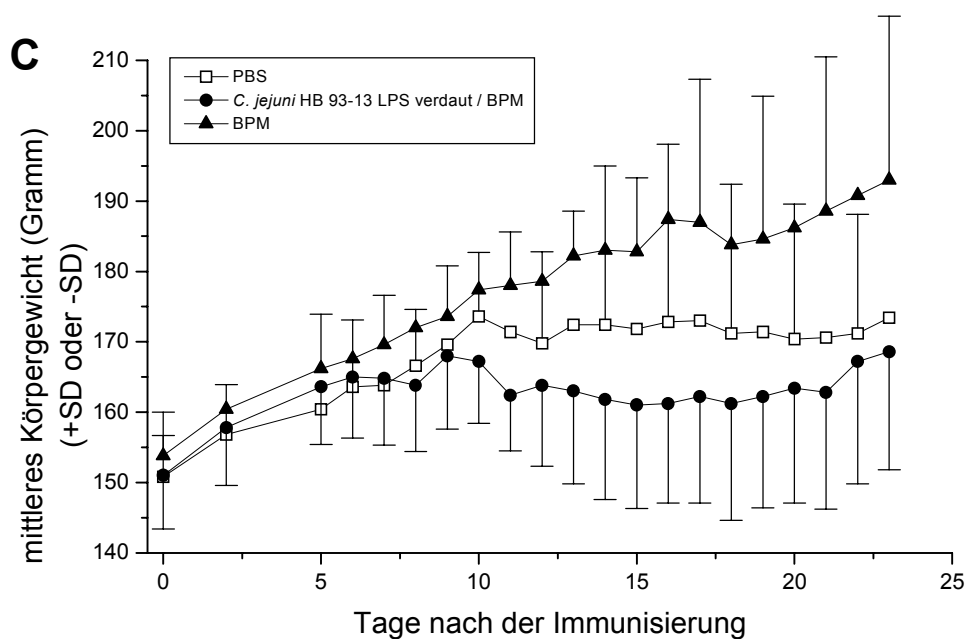


Bild 2.1: Induktion einer Resistenz gegen die myelininduzierte EAN durch die orale Gabe von Myelin und die Blockade der Resistenzinduktion durch zusätzliche Gabe von *C. jejuni*-LPS als orale Adjuvans.

Fünf Lewis Ratten pro Gruppe wurden jeden zweiten Tag mit PBS oder jeweils 50 mg BPM gefüttert. Das Antigen wurde alleine oder zusammen mit 5 mg Pronase K-verdaulichem *C. jejuni*-LPS verabreicht (A). Zusätzlich wurde auch nur mit 5 mg Pronase K-verdaulichem *C. jejuni*-LPS gefüttert (B). Einen Tag nach der letzten Fütterung wurden die Tiere mit 3,75 mg BPM/Tier in CFA wie in 4.5.2 beschrieben immunisiert. Die Tiere wurden nach klinischen Krankheitszeichen beurteilt (A und B) und täglich gewogen (C).

### 2.3.2 Serologische Untersuchungen

Zusätzlich zu den klinischen Scores wurden die Serum-Titer für Antikörper gegen BPM, SE, *C. jejuni* HB 93-13 Gesamthomogenat und *C. jejuni* HB 93-13 LPS bestimmt (Tabelle 2.2). Die Fütterung von *C. jejuni*-Antigen führte im Vergleich zu Kontrollen (Tiere 901-905 und 916-920) nicht zur Induktion signifikanter *C. jejuni*-spezifischer Antikörpertiter. Die Zugabe von *C. jejuni*-LPS zum oralen Myelin induzierte signifikant höhere anti-Myelin Antikörpertiter als die Fütterung von Myelin alleine. Zudem generierten LPS-gefütterte Tiere signifikant höhere anti-BPM Antikörpertiter als PBS-gefütterte Tiere, ohne dass der Krankheitsverlauf der EAN hierdurch verändert wurde.

Tabelle 2.2: Antikörpertiter gegen Myelin, sauren Extrakt (SE), *C. jejuni* HB 93-13 und *C. jejuni* HB 93-13 LPS.

Untersucht wurden die Seren der Tiere 901-925 nach der ELISA Methode aus Kapitel 4.8.

gefüttert mit	Tier-Nummer	BPM	SE	HB 93-13	HB 93-13 LPS
PBS	901	1024	256	32	32
	902	1024	256	32	32
	903	2048	512	32	64
	904	2048	1024	32	32
	905	1024	256	32	<32
<i>C. jejuni</i> HB 93-13 LPS verdaut	906	4096	512	32	512
	907	4096	1024	32	64
	908	1024	128	32	128
	909	4069	512	32	128
	910	4069	256	32	64
<i>C. jejuni</i> HB 93-13 LPS verdaut /BPM	911	<b>8192</b>	8192	32	32
	912	<b>8192</b>	1024	64	64
	913	<b>16384</b>	2048	64	64
	914	<b>16384</b>	512	32	64
	915	<b>1024</b>	64	32	32
BPM	916	2048	1024	<32	32
	917	2048	10324	64	64
	918	1024	128	<32	<32
	919	2048	512	<32	256
	920	1024	256	32	256
HB 93-13	921	2048	1024	64	128
	922	4096	4096	64	128
	923	2048	256	32	64
	924	1024	256	32	128
	925	2048	256	64	128

## 2.4 Einflüsse enteraler *C. jejuni*-Antigene auf die aktive Induktion einer Myelin-EAN

### 2.4.1 Klinischer Verlauf

Zur Untersuchung, ob ein Gemisch von *C. jejuni*-Proteinen und -LPS (Gesamt-*C. jejuni*) orale Toleranz induzieren oder die Immunantwort auf Immunisierung mit BPM beeinflussen kann, wurden Lewis Ratten fünfmal innerhalb von zehn Tagen mit Puffer bzw. Gesamt-*C. jejuni* gefüttert. Einen Tag nach der letzten oralen Applikation wurde durch subkutane Immunisierung mit BPM in CFA eine aktive EAN ausgelöst.

Die PBS-gefütterten Kontrolltiere erkrankten ab Tag 12 nach der Immunisierung und erreichten einen maximalen Krankheitsgrad von 3 bis 4 mit einem längeren Plateau. Die mit Gesamt-*C. jejuni* gefütterten Ratten zeigten an Tag 11 nach Immunisierung erste Krankheitszeichen in Form von Lähmungen der Schwanzspitze. Bis zum Tag 18 steigerte sich der Krankheitsgrad auf ein Maximum von 6, was mittelschweren Paraparesen entspricht. Ab Tag 19 erholten sich die Tiere langsam und bis zum Versuchsende an Tag 23 zeigten die *C. jejuni*-gefütterten Tiere noch eine Gangataxie oder geringe Paraparese der Hinterbeine (Bild 2.1 A).

Die Veränderungen im Körpergewicht unterstreichen die Unterschiede in den Lähmungsgraden: die mit PBS gefütterte Kontrollgruppe verlor im Gegensatz zu den Gesamt-*C. jejuni*-gefütterten Tieren, die durchschnittlich 20 bis 30 Gramm Gewicht abnahmen, fast kein Gewicht (Bild 2.1 B).

Bei gleichem Versuchsansatz wurde der Versuch wiederholt. Das Ergebnis wich jedoch erheblich vom ersten Ergebnis ab, da die *C. jejuni*-gefütterten Tiere diesmal weniger stark erkrankten als die PBS-gefütterten Kontrolltiere (Bild 2.2 A). Die Kontrolltiere erkrankten ab Tag 13 nach der Immunisierung, erreichten an Tag 19 ein Maximum der Erkrankung und erholten sich bis zum Tag 27 nach Immunisierung wieder vollständig. Die *C. jejuni*-gefütterten Tiere hingegen zeigten zwischen Tag 15 und Tag 26 nach der Immunisierung lediglich einen reduzierten Schwanztonus und Schwanzlähmungen.

Das mittlere Körpergewicht reflektiert den Unterschied in den klinischen Krankheitsgraden, da die PBS-gefütterten Kontrolltiere über 15 Gramm Gewicht verloren, die *C. jejuni*-gefütterten Tiere nur durchschnittlich 5 Gramm (Bild 2.2 B).

Die Ergebnisse der beiden Experimente waren gegensätzlich, da eine vorangehende enterale *C. jejuni*-Antigen-Applikation die EAN einmal verstärkte, ein anderes mal abschwächte.

Um zu testen, ob es sich hierbei um einen *C. jejuni*-spezifischen Effekt handeln könnte, wurde zusätzlich zu den PBS-gefütterten Tieren als weitere Kontrolle *Salmonella typhimurium*-Antigen als gram-negatives enteropathogenes Bakterium verwendet. Lewis Ratten wurden fünfmal innerhalb von zehn Tagen mit Natriumazid-inaktiviertem *Salmonella*-Antigen gefüttert. Einen Tag nach der letzten oralen Applikation wurde eine aktive EAN durch subkutane Immunisierung mit BPM in CFA ausgelöst.

Die mit PBS-gefütterten Kontrollen zeigten bereits an Tag 11 nach der Immunisierung eine deutliche Erkrankung mit Paraparese der Hinterbeine. Bis zum Tag 13 erreichten sie ein Maximum des Krankheitsgrades mit schwerer Paraparese, teilweise Tetraparese. Ab Tag 17 erholten sich die PBS-Kontrollen wieder langsam, jedoch bis zum Versuchsende an Tag 33 nach der Immunisierung nur partiell bis zum Krankheitsgrad 4 bis 5.

Die Gruppe der *Salmonellen*-gefütterten Tiere wurde später krank, nämlich ab Tag 12 nach der Immunisierung. Im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren erkrankten die Tiere langsamer, erreichten an Tag 17 jedoch ebenfalls ein Maximum des Krankheitsgrades mit Tetraparesen. Die Erholungsphase setzte ebenfalls an Tag 18 nach der Immunisierung ein, wobei sich die *Salmonella*-gefütterten Tiere schneller erholten als die PBS-gefütterten Tiere und bis zum Versuchsende nur noch geringe Krankheitszeichen in Form von Schwanzlähmungen und einem verringerten Schwanztonus zeigten.

Die Ergebnisse der Gewichtsaufzeichnungen entsprechen den gezeigten Ergebnissen des Krankheitsgrades, wobei die Tiere ab Tag 10 bis Tag 16 kontinuierlich abnahmen, das Gewicht aber ab Tag 17 wieder stieg und am Versuchsende an Tag 33 über dem Ausgangsgewicht lag (Bild 2.3 A und B).

Bei einer weiteren Verwendung von *Salmonella*-Antigenen als Kontrollantigenen (Bild 2.4) zeigte sich bis Tag 22 nach der Immunisierung kein Unterschied zwischen der mit *Salmonella*-Antigenen gefütterten Gruppe und der Kontrollgruppe. Erst danach wurde die schlechtere Erholung der mit *Salmonella*-Antigenen gefütterten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar (Bild 2.4 A).

Das Gewicht stieg in beiden Gruppen bis zum Tag 14 nach der Immunisierung, danach fiel es wiederum in beiden Gruppen bis Tag 20 und blieb bis zum Versuchsende auf diesem Niveau (Bild 2.4 B).



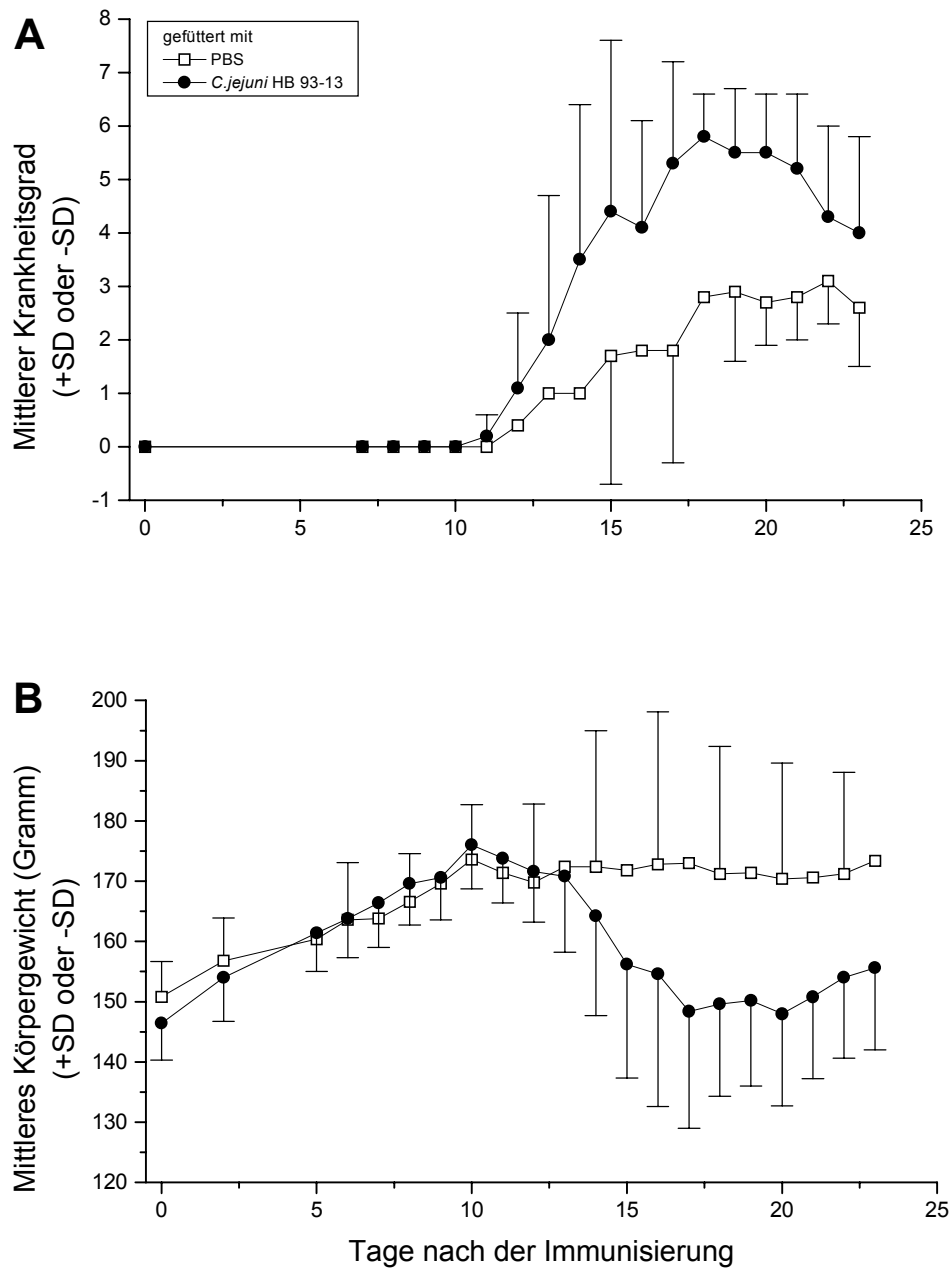


Bild 2.1: Beeinflussung der aktiven EAN durch die orale Gabe von Gesamt-*C. jejuni* vor Induktion einer Myelin-EAN.

Fünf Lewis Ratten pro Gruppe wurden jeden zweiten Tag mit jeweils 25 mg Gesamt-*C. jejuni* HB 93-13 gefüttert, wobei die Kontrolltiere parallel mit 0,5 ml PBS gefüttert wurden. Einen Tag nach der letzten Fütterung wurden die Tiere mit 3,75 mg BPM/Tier in CFA wie in 4.5.2 beschrieben, immunisiert. Die Tiere wurden nach klinischen Krankheitszeichen beurteilt (A) und täglich gewogen (B).

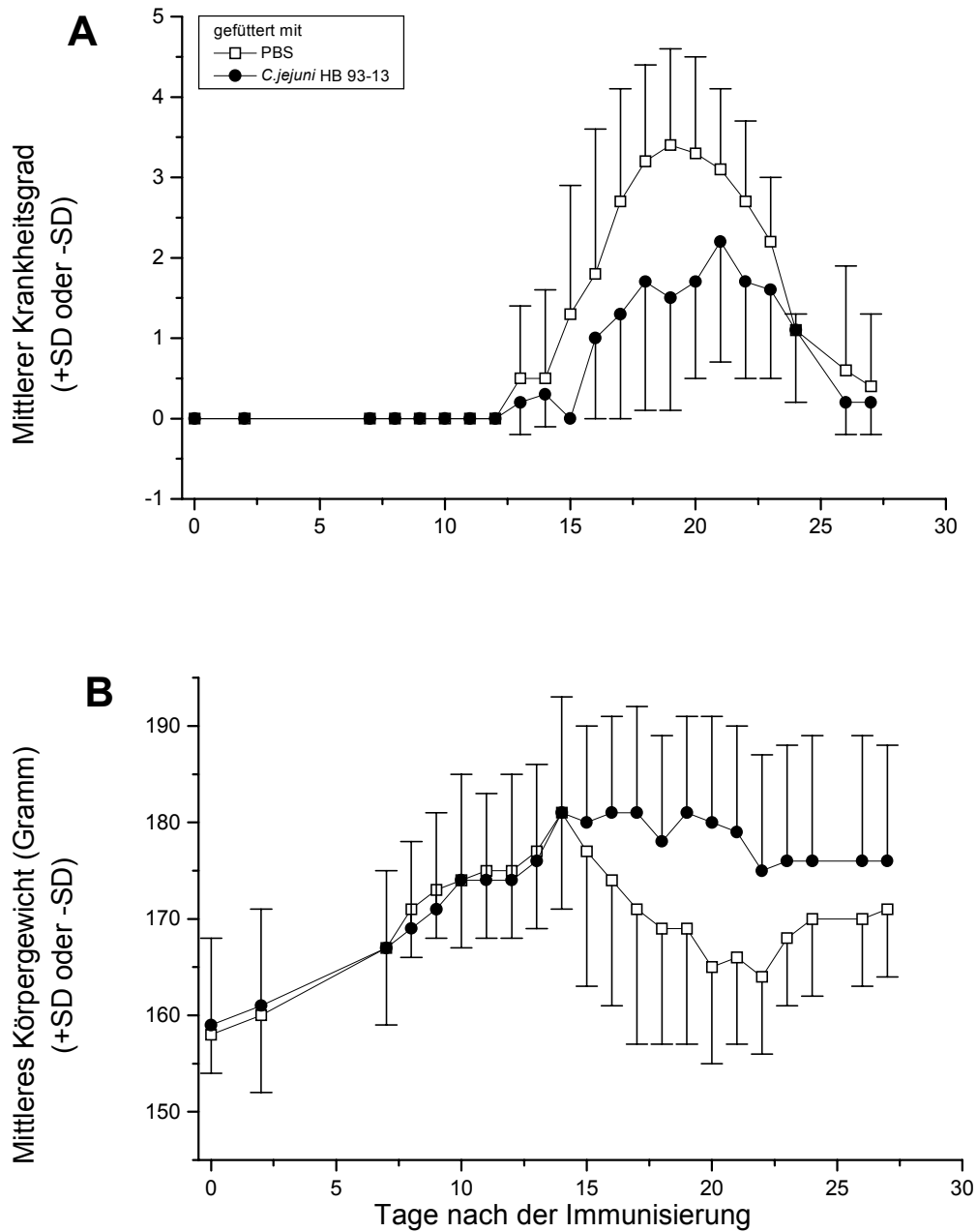
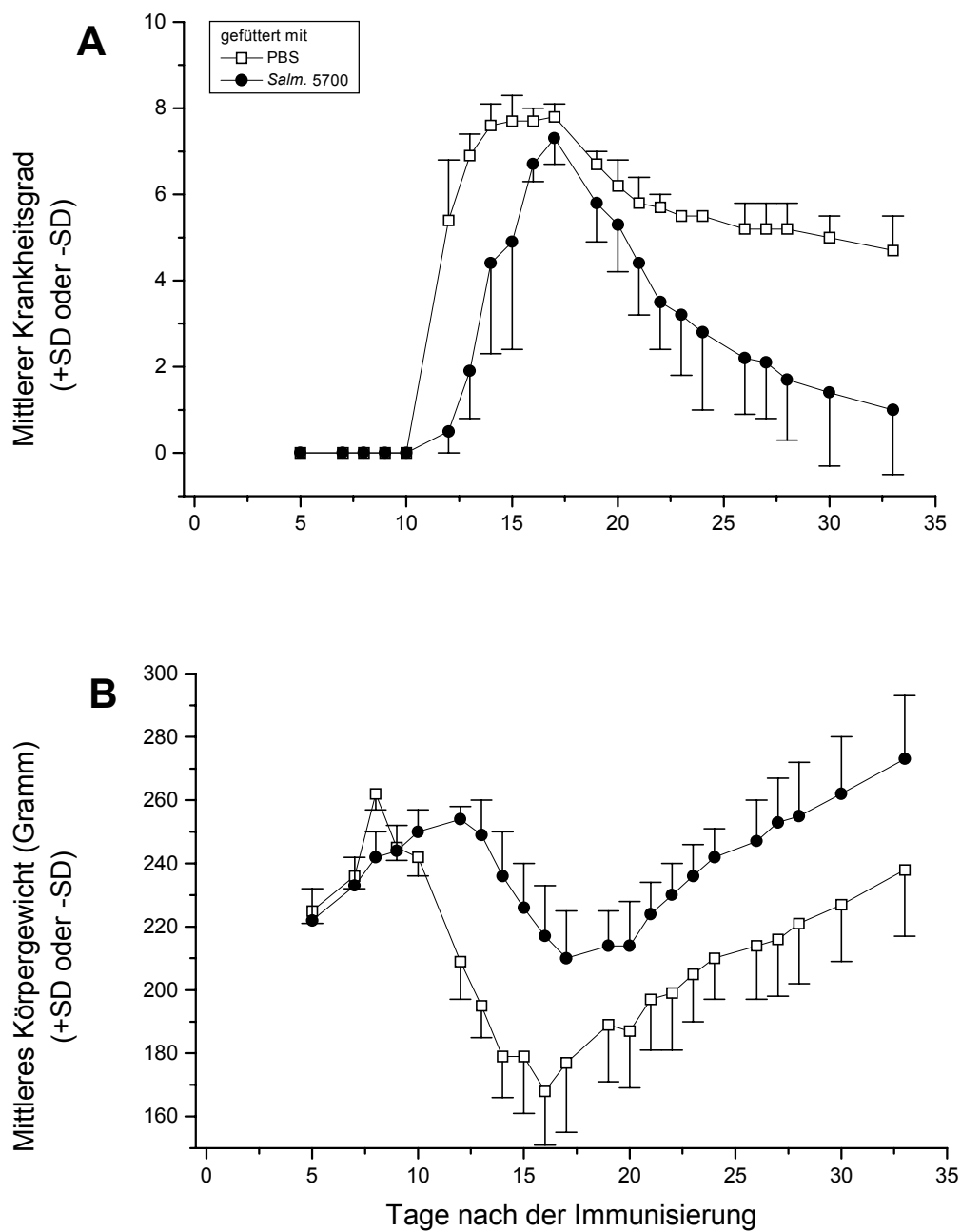
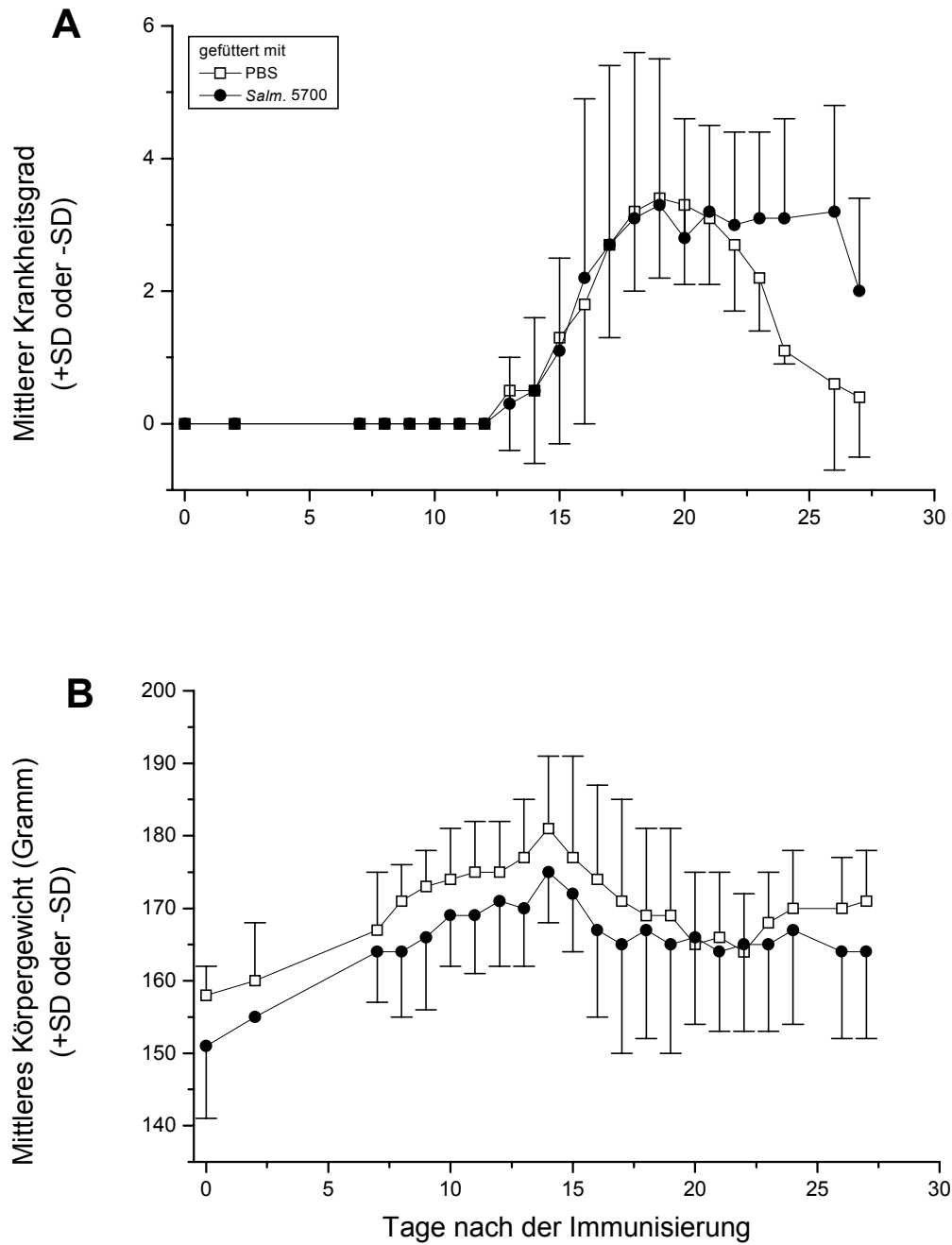


Bild 2.2: Weiterer Versuch zur Beeinflussung der aktiven EAN durch die orale Gabe von Gesamt-*C. jejuni* vor Induktion einer Myelin-EAN.

Fünf Lewis Ratten pro Gruppe wurden jeden zweiten Tag mit jeweils 25 mg Gesamt-*C. jejuni* HB 93-13 gefüttert, wobei die Kontrolltiere parallel mit 0,5 ml PBS gefüttert wurden. Einen Tag nach der letzten Fütterung wurden die Tiere mit 3,75 mg BPM/Tier in CFA wie in 4.5.2 beschrieben, immunisiert. Die Tiere wurden nach klinischen Krankheitszeichen beurteilt (A) und täglich gewogen (B).



*Bild 2.3: Beeinflussung der aktiven EAN durch die orale Gabe von Salmonella typhimurium-Antigenen vor Induktion einer Myelin-EAN. Fünf Lewis Ratten pro Gruppe wurden jeden zweiten Tag mit jeweils 25 mg Salmonella typhimurium gefüttert, wobei die Kontrolltiere parallel mit 0,5 ml PBS gefüttert wurden. Einen Tag nach der letzten Fütterung wurden die Tiere mit 3,75 mg BPM/CFA wie in 4.5.2 beschrieben, immunisiert. Die Tiere wurden nach klinischen Krankheitszeichen beurteilt (A) und täglich gewogen (B).*



*Bild 2.4: Weiterer Versuch zur Beeinflussung der aktiven EAN durch die orale Gabe von Salmonella typhimurium-Antigen vor Induktion einer Myelin-EAN. Fünf Lewis Ratten pro Gruppe wurden jeden zweiten Tag mit jeweils 25 mg Salmonella typhimurium gefüttert, wobei die Kontrolltiere parallel mit 0,5 ml PBS gefüttert wurden. Einen Tag nach der letzten Fütterung wurden die Tiere mit 3,75 mg BPM/CFA wie in 4.5.2 beschrieben, immunisiert. Die Tiere wurden nach klinischen Krankheitszeichen beurteilt (A) und täglich gewogen (B).*

## 2.4.2 Histologische Untersuchungen

Da im vorherigen ersten Versuch (Bild 2.1) die enterale Gabe von Gesamt-*C. jejuni* HB 93-13 zu einem schwereren Verlauf der aktiven EAN als bei den PBS-gefütterten Kontrolltieren geführt hat, wurden diese Tiere histopathologisch und immunhistochemisch untersucht.

Zu diesen histologischen Untersuchungen der Veränderungen im PNS wurde den Tieren an Tag 23 nach der Immunisierung der *Nervus ischiadicus* entnommen. Die Semidünnschnitte der Nerven von Ratten, die mit PBS gefüttert wurden, weisen eine milde Demyelinisierung der Axone auf (Bild 2.5 A). Dagegen zeigen die mit *C. jejuni* HB 93-13-gefütterten Tiere eine deutlich ausgeprägtere Ausdehnung der Demyelinisierung der Axone (Bild 2.5 B). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen wird auch in der höheren Vergrößerung deutlich (Bild 2.5 C und D), wobei bei den *C. jejuni*-gefütterten Tieren neben demyelinisierten auch degenerierte Axone erkennbar sind, die bei den Kontrolltieren kaum zu finden waren (Bild 2.5 D).

Die Hämalaun-Eosin-Färbung des Ischiasnervs (siehe 4.6.4) bei den Kontrolltieren zeigt, dass die entzündlichen Infiltrate fokal sind (Bild 2.5 E), bei den *C. jejuni*-gefütterten Tieren dagegen der ganze Nerv betroffen ist (Bild 2.5 F).

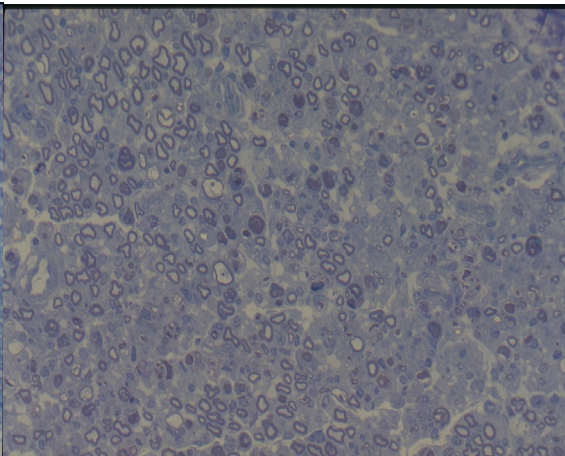
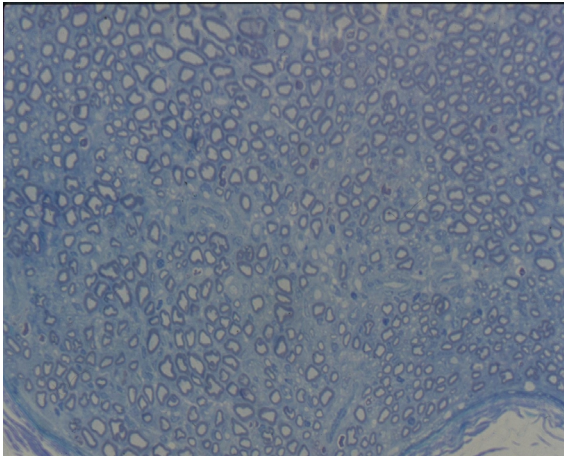
Zur näheren Charakterisierung der infiltrierenden Zellen wurden immunhistochemische Untersuchungen (siehe 4.6.5) an den Paraffinschnitten durchgeführt. Bei der Färbung CD4-positiver Zellen ist erkennbar, dass bei den Kontrolltieren ein großer Teil der entzündlichen Zellen im Nerv T-Helferzellen sind (Bild 2.5 G), bei den *C. jejuni*-gefütterten Ratten ist die Menge im Vergleich nicht wesentlich höher, eher geringer (Bild 2.5 H). Dagegen zeigen sich bei der Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen ED1, dass bei den *C. jejuni*-gefütterten Tieren mehr aktivierte Makrophagen vorhanden sind (Bild 2.5 J) als bei den Kontrolltieren (Bild 2.5 I).

PBS-Kontrolltiere

*C. jejuni* HB 93-13 gefütterte Tiere

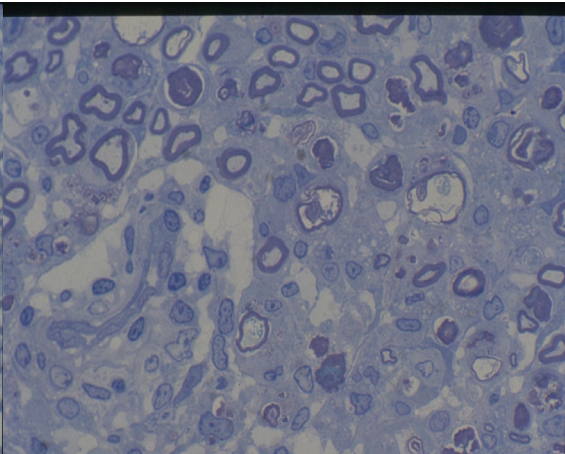
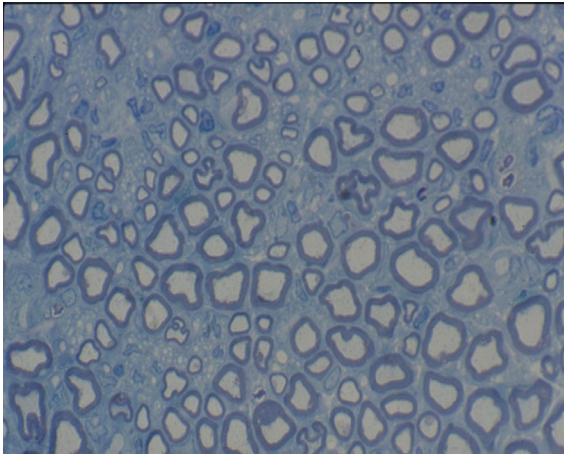
**A**

**B**



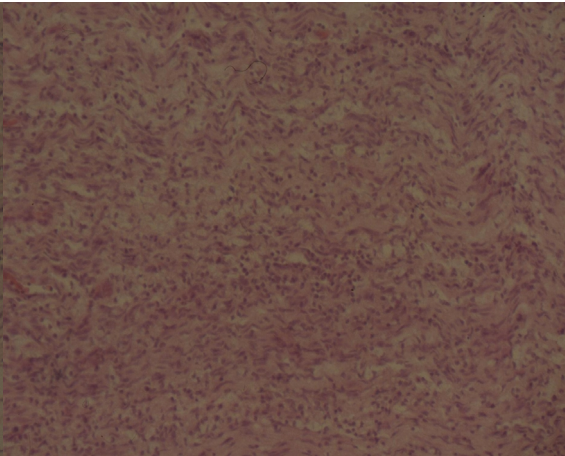
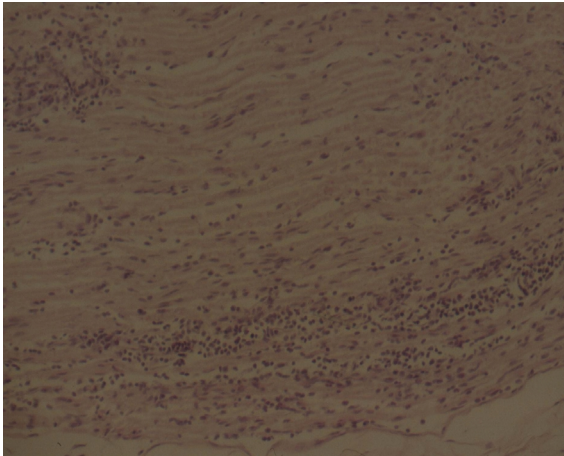
**C**

**D**

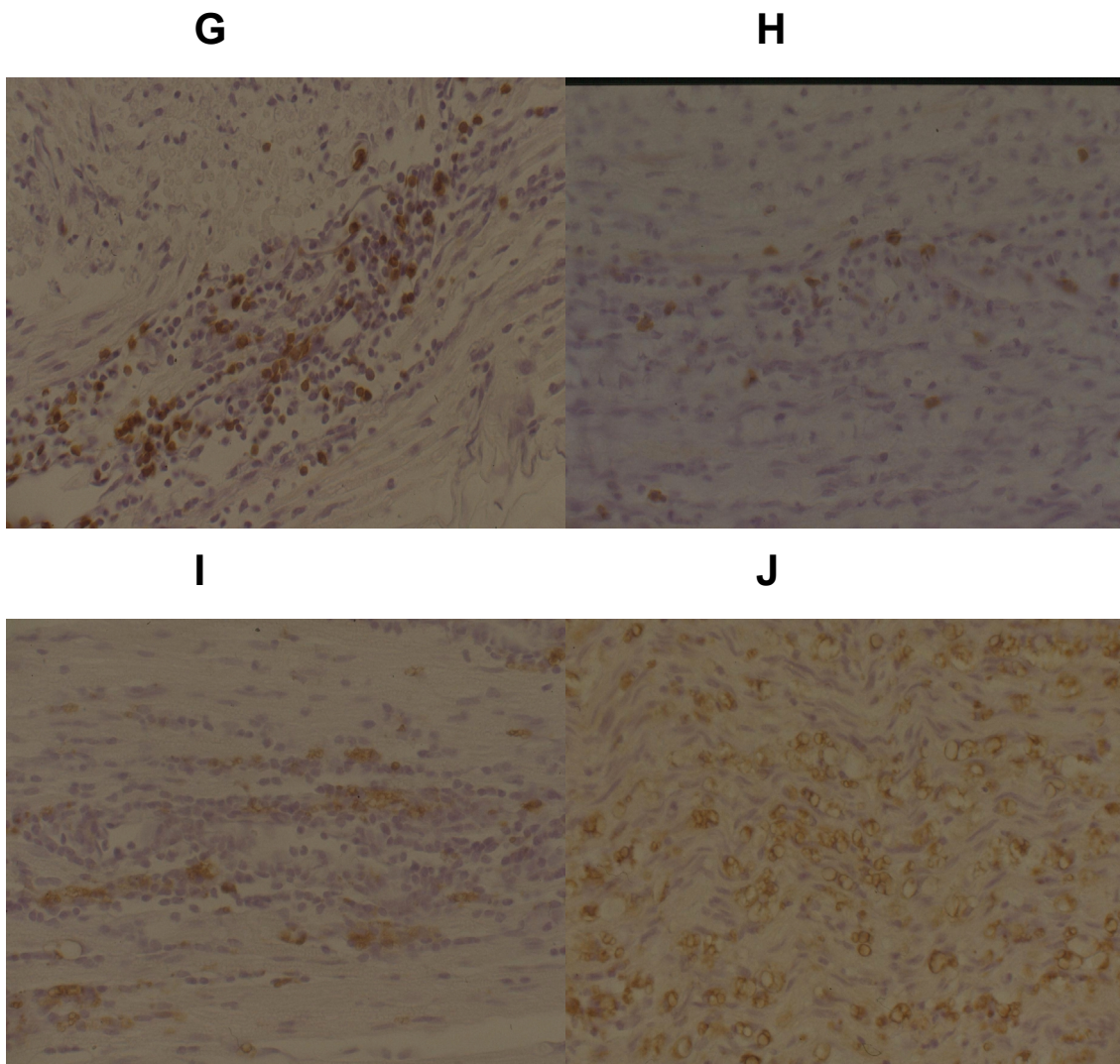


**E**

**F**







*Bild 2.5: Längsschnitte durch die Ischiasnerven von PBS-gefütterten Kontrolltieren (A, C, E, G und I) und C. jejuni HB 93-13-gefütterten Tieren (B, D, F, H, und J) 23 Tage nach Induktion der aktiven EAN.*

*A, B, C und D sind Semidünnschnitte an denen zu erkennen ist, dass bei den PBS-gefütterten Kontrolltieren die Myelinscheiden besser erhalten sind (A und C), wohingegen bei den C. jejuni-gefütterten Tieren eine ausgedehnte Demyelinisierung und axonale Degeneration im Nerv zu sehen sind (B und D). Durch die Hämalaun-Eosin-(HE)-Färbungen in E und F wird die Infiltration der Nerven durch T-Zellen sichtbar. Die eingewanderten Zellen wurden mit Hilfe des mAk gegen Ratten-CD4 (Klon 15-8A2) (G und H) sowie des mAk gegen Makrophagen (Klon ED1) (I und J) charakterisiert.*

## 2.5 Zelluläre Untersuchungen in der Lewis-Ratte

### 2.5.1 Generierung *C. jejuni*-spezifischer Ratten-Zell-Linien

Um eine mögliche Neuritogenität der *C. jejuni*-Antigene auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden *C. jejuni*-spezifische Ratten-Zell-Linien generiert und charakterisiert.

Zur Generierung *C. jejuni*-spezifischer T-Zellen aus der Ratte wurden Lewis Ratten in die Hinterpfote subkutan mit Natriumazid-inaktiviertem *C. jejuni*-Antigen in CFA immunisiert. 13 Tage nach der Immunisierung wurden die poplitealen Lymphknoten und die Milz entnommen und in Gegenwart von *C. jejuni*-Antigen, Myelin, definierten Myelinbestandteilen, dem Mitogen Concanavalin A oder PPD kultiviert.

Jede Säule in Bild 2.1 und Bild 2.2 repräsentiert die Ergebnisse aus Triplikat-Kulturen der verschiedenen Kulturansätze der Lymphozyten aus den Lymphknoten oder der Milz von jeweils einer Lewis Ratte. Durch die spezifische Stimulation mit *C. jejuni*-Antigen wurden vor allem die *C. jejuni*-spezifischen Zellen weiterkultiviert, wodurch das spezifische Wachstum mit *C. jejuni*-Antigen zunahm.

In Bild 2.1 ist die Primärstimulation dargestellt. Es zeigte sich, dass die Lymphozyten aus den Lymphknoten wesentlich stärker durch ConA stimuliert wurden als die Lymphozyten aus der Milz. Desweiteren ist erkennbar, dass bei beiden Lymphozytenpopulationen mit Gesamt-*C. jejuni* 5647-Antigen ein stärkeres Wachstum erfolgte als mit Gesamt-*C. jejuni* 5646-Antigen, obwohl mit diesem immunisiert wurde. Es zeigte sich keine Kreuzreaktivität mit BPM oder SE.

Wie erwähnt sind in Bild 2.1 die Primärstimulationen, in Bild 2.2 zwei der generierten *C. jejuni*-spezifischen Zell-Linien dargestellt. Es ist keine Reaktivität mit PPD mehr und keine Kreuzerkennung von BPM und SE erkennbar. Wie jedoch auch schon im Primäransatz reagierten beide Linien stärker mit *C. jejuni* 5647 Antigen als mit *C. jejuni* 5646 Antigen.

Ein Teil der Zellen wurde in Primärkultur nicht nur mit *C. jejuni*-Antigenen, sondern auch mit BPM oder SE stimuliert und expandiert. In diesen Kulturansätzen sind jedoch keine Zellen ausgewachsen, was den Proliferationsdaten der Primärantwort entspricht.



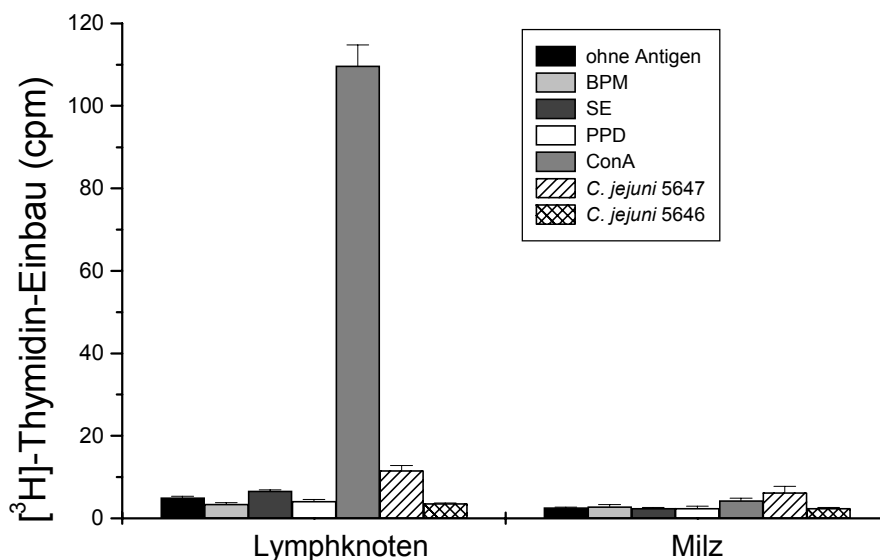


Bild 2.1: Den Tieren wurden an Tag 13 nach der Immunisierung mit Gesamt-*C. jejuni* die poplitealen Lymphknoten und die Milz entnommen, in Triplikaten mit den genannten Antigenen stimuliert und über 3 Tage kultiviert. Dabei wurden die Antigene in folgenden Konzentrationen eingesetzt: BPM 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SE 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PPD 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ConA 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , *C. jejuni* jeweils 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Proliferation wurde durch  $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbau bestimmt.

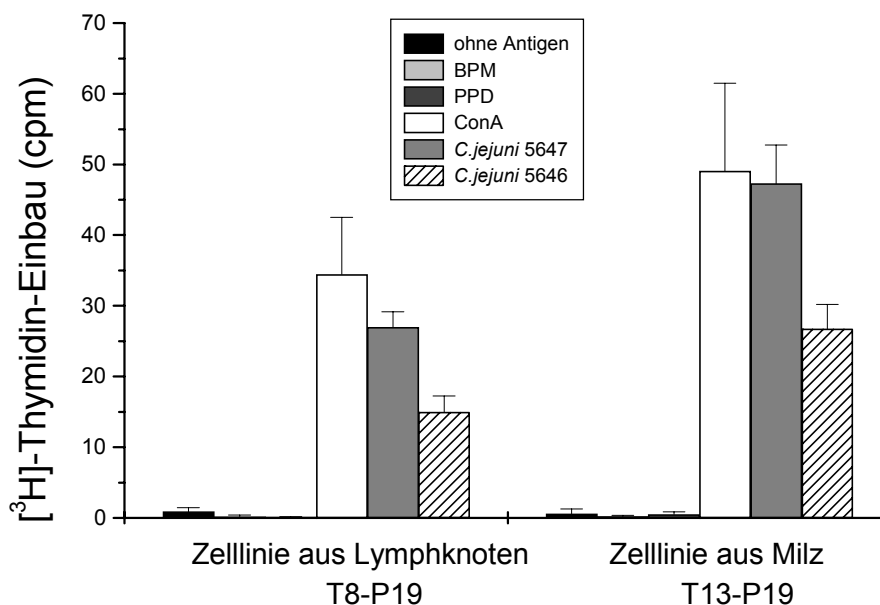


Bild 2.2: Generierung *C. jejuni*-spezifischer T-Zell-Linien aus Ratten nach subkutaner Gabe von *C. jejuni*-Antigen aus poplitealen Lymphozyten und Milzzellen. Die Zellen wurden in Triplikaten mit den genannten Antigenen stimuliert und über 3 Tage kultiviert. Dabei wurden die Antigene in folgenden Konzentrationen eingesetzt: BPM 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SE 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PPD 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ConA 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , *C. jejuni* jeweils 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Die Proliferation wurde durch  $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbau bestimmt.

### 2.5.2 I.V. Gabe von *C. jejuni*-spezifischen Ratten-Zellen

Um zu überprüfen, ob mit *C. jejuni*-spezifischen Ratten-Zellen wie mit P2-spezifischen Zellen eine AT-EAN ausgelöst werden kann, wurden zwei Tieren je 17 Mio T13-P19 *C. jejuni*-spezifische Ratten-Zellen gespritzt. 10 Tage nach der Immunisierung zeigten sich keine Krankheitszeichen oder andere Auffälligkeiten und der Versuch wurde beendet, da mit P2-spezifischen Zellen bereits ca. 4 Tage nach Induktion eine AT-EAN auftrat.

### 2.5.3 Phänotyp *C. jejuni*-spezifischer Ratten-Zell-Linien

Um den Phänotyp der *C. jejuni*-spezifischen Ratten-Zell-Linien zu bestimmen, wurden die Oberflächenantigene fluoreszenzgefärbt und mittels durchflußzytologischer FACS-Analyse bestimmt (siehe 4.11.5).

In Bild 2.1 ist das Ergebnis für die Linie T8-P19 dargestellt. Für die Linie T13-P19 ergab sich das gleiche Ergebnis. Somit handelt es sich bei beiden Linien um  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptor positive, CD 4 positive und CD 8 negative Zellen.

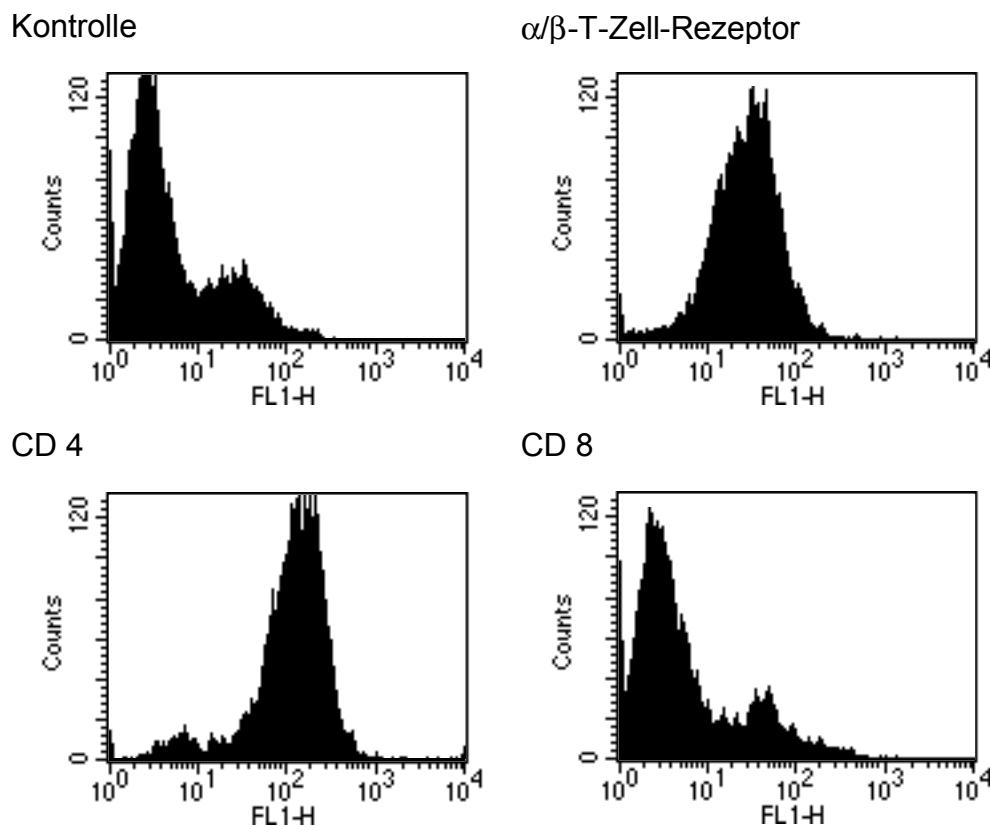


Bild 2.1: Die *C. jejuni*-spezifische (*C. jejuni* 5647) T-Lymphozytenlinie T8-P19 aus Lymphknoten exprimiert auf ihrer Oberfläche den  $\alpha/\beta$ -T-Zellrezeptor und gehört zum  $CD4^+/CD8^-$ -Phänotyp.

## 2.6 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen *C. jejuni*-LPS

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen LPS verschiedener *C. jejuni*-Stämme wurden Balb/c-Mäuse, wie in 4.10 beschrieben, immunisiert und die Milzzellen mit Maus Ag8-Zellen fusioniert.

Dabei konnten in verschiedenen Fusionen mit je 960-1940 Mikrokulturen jeweils ca. 20% als wachsende Hybridome im ELISA auf *C. jejuni*-Antikörperproduktion getestet werden.

### 2.6.1 Reaktivität im ELISA

In screening-ELISAs wurden die Hybridom-Kulturüberstände, die die gebildeten Antikörper enthalten, zunächst auf Reaktivität mit dem zur Immunisierung der Balb/c-Maus eingesetzten *C. jejuni*-LPS und Gesamtextrakt des entsprechenden *C. jejuni*-Stamms getestet. Wurden spezifische Antikörper vom Typ IgG oder IgM nachgewiesen, wurden die entsprechenden Hybridome weiter kultiviert und die Kulturüberstände in weiteren ELISAs mit Pronase K verdaulichem LPS und Gesamtextrakten verschiedener anderer *C. jejuni*-Stämme getestet. Die *C. jejuni*-reaktiven Antikörper reagierten in fast allen Fällen mit Protein-Epitopen, da in mit Pronase K verdaulichem LPS beschichteten ELISA-wells jeweils keine Reaktion stattfand (die meisten Ergebnisse sind nicht gezeigt). Nur wenige der hergestellten Hybridome produzierten Antikörper mit Spezifität für *C. jejuni*-LPS. Einige Hybridome produzieren IgG-Antikörper mit einer sehr ausgeprägten Spezifität für *C. jejuni*-Protein, z.B. in Tabelle 2.5 Klon-Nr. 20 und Klon-Nr. 22. Siehe Tabelle 2.3, Tabelle 2.4, Tabelle 2.5, Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7.

Das in den Tabellen gezeigte Ergebnis bezieht sich nur auf den screening-Test; in der Ergebnisspalte sind mit IgG und IgM die entsprechenden Isotypen der Antikörper angegeben.

Die in Tabelle 2.4 und Tabelle 2.7 dargestellten Werte zeigen, dass die von den Hybridomen gebildeten mAk spezifisch mit *C. jejuni*-LPS reagieren, da auch mit verdaulichem *C. jejuni*-LPS eine Stimulation erzielt wird.

Tabelle 2.3: Ig-Typ und Spezifitätsbestimmung von Hybridomen gegen Gesamt-C. jejuni PG 836 und C. jejuni PG 836 LPS. Die Bestimmung wurde mittels ELISA durchgeführt und die Werte geben die optische Dichte (OD) bei 405 nm wieder.

		2. AK: anti-IgG			2. AK: anti-IgM			Ergebnis
		Beschichtung mit						
Klon-Nr.	intern	EtOH	PG 836	PG 836 LPS	EtOH	PG 836	PG 836 LPS	
1	122	0,45	0,386	<b>0,588</b>	0,388	0,38	<b>0,589</b>	IgM
2	78	0,431	0,387	0,475	0,294	0,406	<b>0,569</b>	IgM
3	132	0,372	0,37	<b>0,564</b>	0,353	0,286	<b>0,614</b>	IgM
10	217	0,48	<b>0,707</b>	<b>0,655</b>	0,449	0,472	<b>0,695</b>	IgG
11	103	0,419	0,482	<b>0,625</b>	0,55	0,466	0,445	IgG
12	101	0,272	0,335	0,388	0,234	0,39	<b>0,638</b>	IgM
14	219	0,376	0,363	<b>0,641</b>	0,386	0,387	<b>0,627</b>	IgM
20	102	0,305	0,213	0,276	0,246	<b>0,466</b>	0,293	IgM
23	48	0,104	<b>0,329</b>	0,105	0,115	0,108	0,123	IgG

Tabelle 2.4: IgG-Typ und Spezifitätsbestimmung von Hybridomen gegen mit Pronase K-verdaulichem und unverdaulichem C. jejuni OH 4382 LPS. Die Bestimmung wurde mittels ELISA durchgeführt und die Werte geben die optische Dichte (OD) bei 405 nm wieder. Alle aufgeführten Klone reagieren mit Pronase-verdaulichem C. jejuni OH 4382 LPS.

		2. AK: anti-IgG		2. AK: anti-IgM		
		Beschichtung mit				
interne Nr.	EtOH	OH 4382 LPS vd	OH 4382 LPS	EtOH	OH 4382 LPS vd	OH 4382 LPS
3	0,192	0,119	0,129	0,223	<b>0,545</b>	<b>0,305</b>
237	0,244	0,324	0,262	0,216	<b>0,573</b>	<b>0,429</b>
12	0,192	0,138	0,119	0,223	<b>0,339</b>	<b>0,545</b>

Tabelle 2.5: Ig-Typ und Spezifitätsbestimmung von Hybridomen gegen Gesamt-C. jejuni OH 4382 und C. jejuni OH 4382 LPS. Die Bestimmung wurde mittels ELISA durchgeführt und die Werte geben die optische Dichte (OD) bei 405 nm wieder.

		2. AK: anti-IgG			2. AK: anti-IgM			Ergebnis
		Beschichtung mit						
Klon-Nr.	intern	EtOH	OH 4382	OH 4382 LPS	EtOH	OH 4382	OH 4382 LPS	
3	12	0,122	0,142	0,129	0,166	<b>0,428</b>	<b>0,305</b>	IgM
6	64	0,944	1,199	1,030	0,860	1,083	<b>1,318</b>	IgM
9	159	0,211	<b>0,768</b>	<b>0,433</b>	0,176	0,208	0,251	IgG
13	131	0,193	<b>0,605</b>	0,232	0,205	0,247	0,234	IgG
18	273	0,632	<b>0,810</b>	<b>0,863</b>	0,819	<b>1,346</b>	<b>2,606</b>	IgM
20	283	0,277	<b>2,708</b>	0,416	0,303	0,201	0,435	IgG
22	375	0,156	<b>0,946</b>	0,139	0,109	0,092	0,100	IgG
23	2-1	0,103	0,193	0,107	0,180	<b>1,078</b>	0,177	IgM
28	2-9	0,095	0,131	0,121	0,444	<b>0,937</b>	<b>0,829</b>	IgM
34	2-8	0,101	0,119	0,111	0,338	<b>0,673</b>	<b>0,636</b>	IgM
37	16-9	0,229	0,312	<b>0,717</b>	0,162	0,121	0,198	IgG
38	16-14	0,118	<b>0,805</b>	0,264	0,138	0,209	0,343	IgG
39	8-8	0,186	0,199	<b>0,620</b>	0,187	0,388	<b>1,825</b>	IgM
45	17-3	0,162	<b>0,573</b>	0,281	0,234	<b>0,469</b>	<b>0,339</b>	IgM
51	2-12	0,129	0,197	<b>0,734</b>	0,150	0,170	0,269	IgG
52	5-1	0,304	0,536	0,351	0,328	<b>1,074</b>	0,378	IgM
53	14-13	0,339	<b>0,656</b>	<b>0,795</b>	0,142	0,237	0,185	IgG
54	18-4	0,097	<b>0,913</b>	0,220	0,091	0,141	0,257	IgG

Tabelle 2.6: Ig-Typ und Spezifitätsbestimmung von Hybridomen gegen Gesamt-C. jejuni OH 4384 und C. jejuni OH 4384 LPS. Die Bestimmung wurde mittels ELISA durchgeführt und die Werte geben die optische Dichte (OD) bei 405 nm wieder.

		2. AK: anti-IgG			2. AK anti-IgM			Ergebnis
		Beschichtung mit						
Klon-Nr.	intern	EtOH	OH 4384	OH 4384 LPS	EtOH	OH 4384	OH 4384 LPS	
8	N14	0,284	0,154	<b>3,057</b>	0,116	0,080	0,167	IgG
10	N26	0,702	<b>1,739</b>	0,277	1,004	<b>2,928</b>	1,151	IgM
16	N155	1,379	1,012	<b>2,672</b>	1,023	<b>2,039</b>	<b>3,18</b>	IgM
23	Gö98	0,238	0,227	<b>0,611</b>	0,182	0,15	0,372	IgG
26	N172	0,243	0,302	<b>0,418</b>	0,251	0,359	<b>0,456</b>	IgM
27	N222	0,337	0,300	<b>2,873</b>	0,16	0,153	0,314	IgG
31	N260	0,367	0,366	<b>0,860</b>	0,165	0,168	0,328	IgG
32	N181	0,173	0,140	<b>1,461</b>	0,189	0,143	0,382	IgG
34	N325	0,454	0,388	<b>0,978</b>	0,289	0,406	0,496	IgG
36	20	0,156	0,167	<b>0,388</b>	0,120	0,123	0,205	IgG
37	28	0,179	0,145	<b>0,572</b>	0,185	0,221	<b>1,202</b>	IgM
38	30	0,238	0,215	0,591	0,412	0,427	<b>1,832</b>	IgM
39	31	0,689	<b>0,923</b>	<b>2,003</b>	0,620	<b>1,274</b>	<b>2,891</b>	IgM
50	136	0,436	0,532	<b>0,853</b>	0,896	0,838	<b>1,447</b>	IgM
54	145	0,634	<b>1,431</b>	<b>1,135</b>	0,504	0,568	0,694	IgG
55	161	0,751	<b>1,491</b>	0,793	0,576	0,564	0,378	IgG
56	154	0,424	0,585	0,574	0,601	0,629	<b>1,089</b>	IgM
57	146	0,439	<b>0,809</b>	<b>1,027</b>	0,25	0,305	0,576	IgG
60	163	0,434	<b>1,335</b>	<b>1,031</b>	0,608	0,254	0,264	IgG
64	60	0,381	0,339	<b>0,621</b>	0,342	0,373	0,452	IgG

Tabelle 2.7: IgG-Typ und Spezifitätsbestimmung von Hybridomen gegen *C. jejuni* OH 4384 LPS, jetzt mit Pronase K-verdaulichem und unverdaulichem *C. jejuni* OH 4384 LPS. Die Bestimmung wurde mittels ELISA durchgeführt und die Werte geben die optische Dichte (OD) bei 405 nm wieder. Alle aufgeführten Klone reagieren mit Pronase-verdaulichem *C. jejuni* OH 4384 LPS.

2. AK: anti-IgG			2. AK: anti-IgM			
Beschichtung mit						
interne-Nr.	EtOH	OH 4384 LPS vd	OH 4384 LPS	EtOH	OH 4384 LPS vd	OH 4384 LPS
13	0,241	<b>2,8275</b>	<b>1,157</b>	0,198	0,332	0,190
N-14	0,110	<b>2,351</b>	<b>2,896</b>	0,086	0,121	0,208
92	0,307	0,350	<b>0,497</b>	0,093	0,117	0,230

Tabelle 2.8: Ig-Typ und Spezifitätsbestimmung von Hybridomen gegen Gesamt-*C. jejuni* HB 93-13 und *C. jejuni* HB 93-13 LPS. Die Bestimmung wurde mittels ELISA durchgeführt und die Werte geben die optische Dichte (OD) bei 405 nm wieder.

2. AK: anti-IgG			2. AK: anti-IgM			Ergebnis		
Beschichtung mit								
Klon-Nr.	intern	EtOH	HB 93-13	HB 93-13 LPS	EtOH	HB 93-13	HB 93-13 LPS	
23	44	0,497	0,463	0,563	0,810	<b>1,199</b>	<b>1,049</b>	IgM
30	F7	0,588	0,525	0,443	0,620	<b>1,134</b>	0,828	IgM
40	A6	0,489	0,508	0,360	0,487	<b>0,700</b>	0,464	IgM
46	A42	0,255	0,348	0,287	0,351	<b>0,623</b>	0,433	IgM
51	A46	0,272	0,430	0,301	0,440	<b>0,692</b>	0,481	IgM
55	105	0,179	<b>0,343</b>	0,235	0,152	<b>0,343</b>	0,200	IgM
59	A31	0,651	0,890	0,928	0,706	<b>1,940</b>	<b>1,069</b>	IgM
64	59	0,206	<b>1,799</b>	<b>0,993</b>	0,219	0,173	0,174	IgG
65	95	0,268	<b>1,961</b>	<b>1,531</b>	0,227	0,147	0,223	IgG

### 2.6.2 Reaktivität der mAk im Western Blot

Um zu überprüfen, gegen welche *C. jejuni*-Antigene die *C. jejuni*-spezifischen Antikörper gerichtet sind, wurden Western Blots durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass durch die meisten getesteten Hybridom-Überstände nur eine Bande bei ca. 45 kD erkannt wird (Bild 2.2).

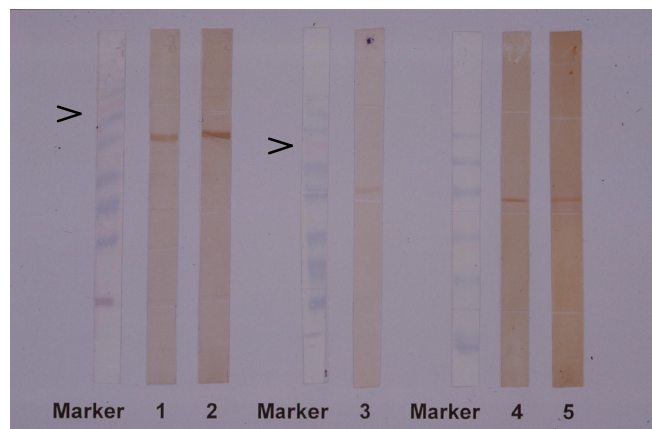
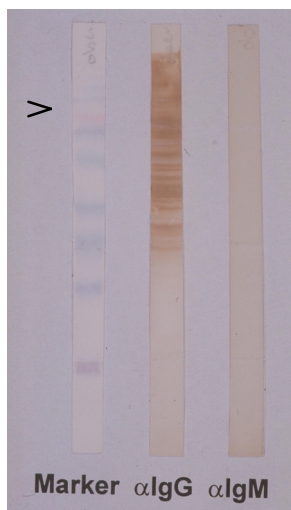


Bild 2.2: Western Blot mit verschiedenen Hybridom-Überständen.

Die ersten beiden Marker von links sind vorgefärbte Marker, wobei die pinkfarbene 65 kD-Bande markiert ist. Danach folgen Banden bei 53, 40, 28, 22, 16 und 9 kD. Beim dritten Marker-Streifen sind sechs Banden bei 98, 64, 50, 36, 30 und 16 kD (von oben) zu erkennen. Als Überstände getestet wurden hier 1 N-3, 2 N-26 (5 µg Gesamt-*C. jejuni* OH 4384/Spur), 3 16-9 (5 µg Gesamt-*C. jejuni* OH 4382/Spur), 4 25 und 5 A-11 (5 µg Gesamt-*C. jejuni* HB 93-13/Spur). Als Zweitantikörper wurde POD-gekoppelter anti-Maus-IgG-Antikörper eingesetzt.

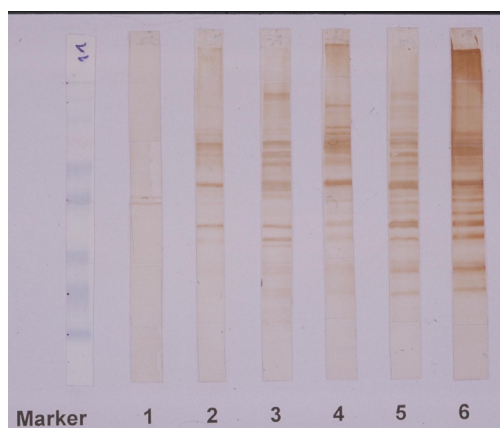
Einige Hybridomüberstände, wie z.B. der Überstand N-14, erkennen nicht nur eine Protein-Bande sondern sehr viele Proteine. Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass der gebildete *C. jejuni*-Protein-spezifische Antikörper ein IgG-Antikörper ist, da mit IgM-spezifischem Detektionsantikörper keine Reaktion im Western Blot gezeigt wird (Bild 2.3).





*Bild 2.3: Western Blot mit Überstand des Hybridoms N-14. Als Protein wurden 5 µg Gesamt-C. jejuni OH 4384/Spur auf das SDS-Gel aufgetragen und als Zweitantikörper wurde POD-gekoppelter anti-Maus-IgG-Antikörper und anti-Maus-IgM-Antikörper verwendet. Mit anti-Maus-IgM zeigt sich keine Reaktion. Als Marker wurde wieder der vorgefärbte Marker verwendet, wobei die 65 kD-Bande markiert ist (vgl. Bild 2.2).*

Ebenfalls mit dem Hybridomüberstand N-14 konnte gezeigt werden, dass der Proteinspezifische mAk nicht stammspezifisch den *C. jejuni*-Stamm erkennt mit dem die Maus ursprünglich immunisiert wurde (hier OH 4384), sondern mit allen getesteten *C. jejuni*-Stämmen kreuzreagiert und auch mit Gesamt-Salmonellen-Antigen eine sehr schwache Reaktivität zeigt (Bild 2.4).



*Bild 2.4: Western Blot mit Hybridomüberstand N-14. Auf das SDS-Gel aufgetragen wurden jeweils 5 µg von 1 Salmonella typhimurium 2 C. jejuni 5646 3 C. jejuni 5647 4 C. jejuni PG 836 5 C. jejuni OH 4384 und 6 C. jejuni HB 93-13. Als Zweitantikörper wurde POD-gekoppelter anti-Maus-IgG-Antikörper verwendet und als Marker der vorgefärbte Marker wie in Bild 2.2.*

### 2.6.3 Reaktivität im Dot Blot

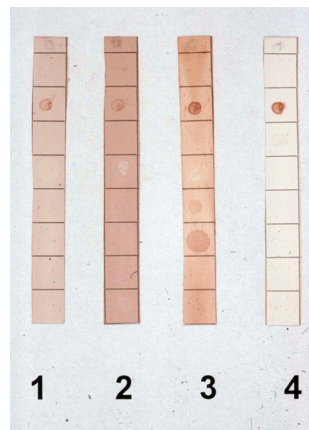
Um eine mögliche Reaktivität der *C. jejuni*-spezifischen Antikörper mit Gangliosiden zu zeigen, wurden Dot Blots durchgeführt.

Zur Kontrolle, ob das System funktioniert, wurde mit *C. jejuni*-Gesamtlysat und mit *C. jejuni*-LPS beschichtet. Dabei zeigte sich für die eingesetzten Hybridom-Überstände eine Reaktion sowohl mit Gesamtlysat als auch mit LPS (ohne Bild).

Wurden die Blot-Streifen jedoch mit unterschiedlichen Gangliosiden beschichtet, zeigte sich für die Hybridom-Überstände keine Reaktion (Bild 2.5). Als Positiv-Kontrolle wurde der Antikörper P2 verwendet, der spezifisch mit dem Gangliosid GD1a reagiert (Lunn et al. 2000).

Beschichtung:

*Aqua dest.*  
Maus-IgG  
Maus IgM  
GM1  
GQ1b  
GD1a  
GT1b  
GD1b



*Bild 2.5: Dot Blot mit verschiedenen Beschichtungen (jeweils 1  $\mu$ l) von oben nach unten Aqua dest, Maus-IgG (0,005  $\mu$ g/ $\mu$ l), Maus-IgM (0,005  $\mu$ g/ $\mu$ l) und die Ganglioside (jeweils in der Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) GM1, GQ1b, GD1a, GT1b, GD1b. Getestet wurden 1 der Hybridom-Überstand N-14, 2 der Hybridom-Überstand 95, 3 der Antikörper gegen GD1a: P2 und 4 als Kontrolle PBS. Als Zweitantikörper wurde POD-gekoppeltes anti-Maus-IgG verwendet. Für den Antikörper P2 zeigte sich eine Reaktion mit dem Gangliosid GD1a und eine schwache Reaktion mit dem Gangliosid GQ1b. Mit den getesteten Hybridom-Überständen N-14 und 95 zeigte sich keine Reaktion.*

#### 2.6.4 Makro-Patch-Clamp Untersuchungen des Effektes *C. jejuni*-spezifischer Antiseren und Antikörper auf die neuromuskuläre Übertragung

Die elektrophysiologischen Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Brigitte Buchwald durchgeführt.

In Bild 2.6 und Bild 2.7 sind die Quantenfreisetzungen an der neuromuskulären Endplatte des Mäusezwerchfells nach Stimulation des *Nervus phrenicus* und Applikation von Ratten-Immunsereen dargestellt. Die Ratten, deren Serum verwendet wurde, wurden vor der Serumgewinnung mit 1 mg Gesamt-*C. jejuni*/CFA immunisiert und nach 3 Wochen mit 1 mg Gesamt-*C. jejuni*/IFA geboostert. Weitere acht bis zehn Tage später wurde das Serum gewonnen.

Nach Applikation von Serum mit HB 93-13-immunisierter Ratten zeigte sich keine Reduktion der präsynaptischen Quantenfreisetzung (Bild 2.6). Nach Zugabe von Serum PG 836-immunisierter Ratten wurde die präsynaptische Quantenfreisetzung stark supprimiert, was nach einem Washout nicht reversibel war (Bild 2.7).

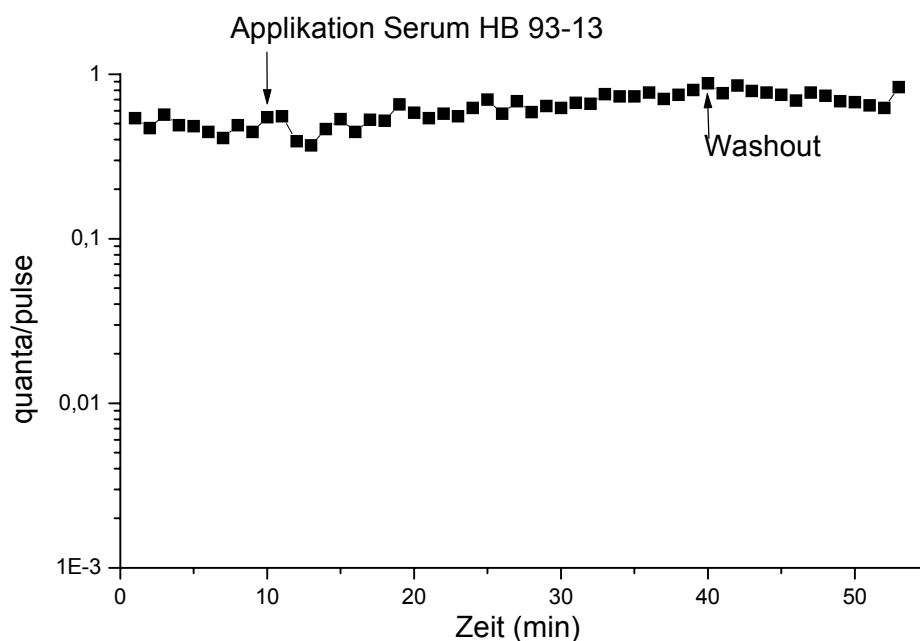


Bild 2.6: Quantenfreisetzung an der neuromuskulären Endplatte des Mäusezwerchfells nach Applikation von *C. jejuni*-Immunsereum der Ratte (Gesamt-*C. jejuni* HB 93-13).

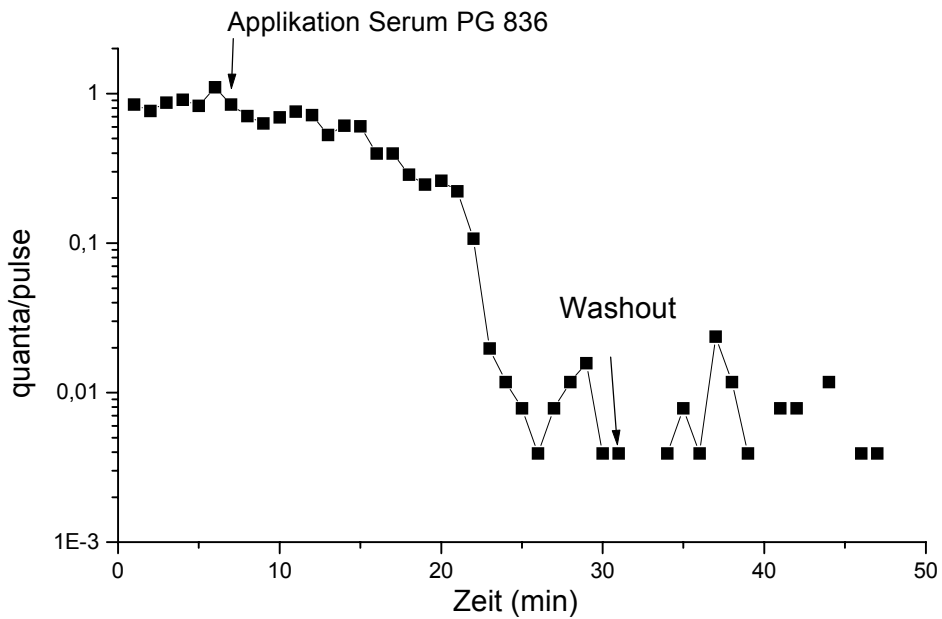


Bild 2.7: Quantenfreisetzung an der neuromuskulären Endplatte des Mäusezwerchfells nach Applikation von *C. jejuni*-Immuneserum der Ratte (Gesamt-*C. jejuni* PG 836).

Wurde der mACh N-14 an der neuromuskulären Endplatte des Mäusezwerchfells appliziert, zeigte sich ein ähnlicher Effekt wie bei der Applikation von *C. jejuni*-Immuneserum PG 836. Nach der Applikation wurde die präsynaptische Quantenfreisetzung reduziert, im Gegensatz zum *C. jejuni*-Immuneserum PG 836 zeigte sich nach dem Washout eine Tendenz zur Erholung. Allerdings konnte auch 40 Minuten nach dem Washout das ursprüngliche Niveau der Quantenfreisetzung noch nicht erreicht werden (Bild 2.8).

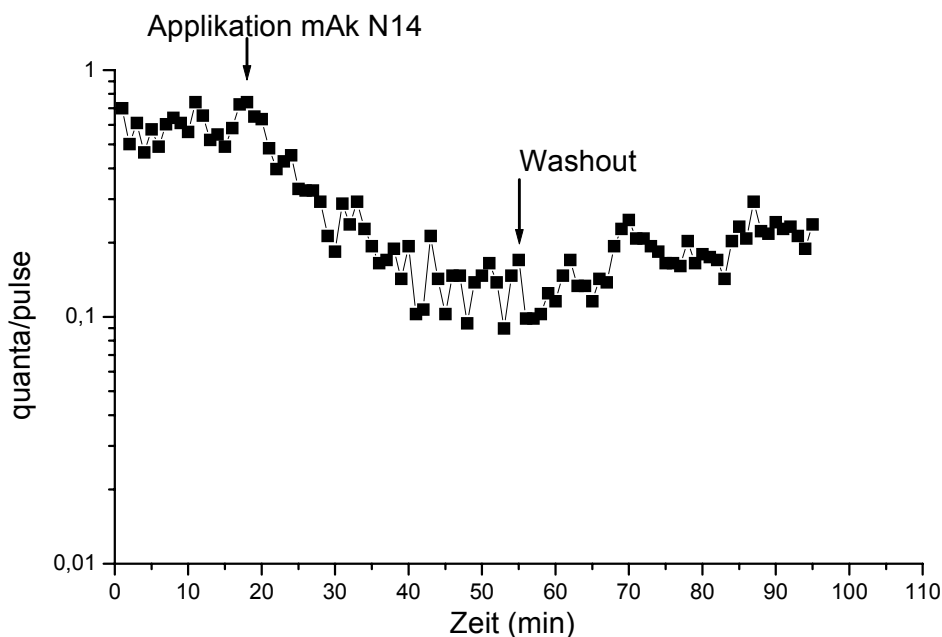


Bild 2.8: Quantenfreisetzung an der neuromuskulären Endplatte des Mäusezwerchfells nach Applikation von 0,2 mg/ml mAk N-14.

## 2.7 Etablierung *C. jejuni*-spezifischer humaner T-Zell-Linien

Die Reaktivitäten und möglichen Kreuzreaktivitäten von T-Zellen werden durch MHC (Major Histocompatibility Complex)-Moleküle bestimmt. Da diese zwischen Mensch und Ratte entscheidende Konformationsunterschiede aufweisen, ist eine Untersuchung der zellulären Immunreaktion gegen *C. jejuni* und Nervenantigene im humanen System erforderlich.

Generiert wurden die Zellen gegen *C. jejuni* HB 93-13. Dieser Stamm wurde aus der Stuhlprobe einer Patientin mit GBS der AMAN-Form isoliert und ist als Penner 19 typisiert, also ein Serovar, das bei GBS signifikant gehäuft gefunden wurde.

### 2.7.1 Zelluläre Immunantwort gegen Gesamthomogenat von *C. jejuni*

Bei der Etablierung *C. jejuni*-spezifischer T-Zell-Linien mit Natriumazid-inaktiviertem *C. jejuni*-Antigen zeigte sich, dass bei sechs von elf gesunden Donoren und bei einer GBS-Patientin *C. jejuni*-spezifische T-Zell-Linien etabliert werden konnten.

Wie in Tabelle 2.9, Tabelle 2.10 und Tabelle 2.11 zusammengefaßt, konnten aus dem peripheren Blut der gesunden Donoren insgesamt 29 T-Zell-Linien etabliert werden. Alle Zellen proliferierten in der Gegenwart von *C. jejuni*-Antigen. Hierbei wurde zum Ansatz der Zellen Gesamt-*C. jejuni* HB 93-13 verwendet. Bei Benutzung verschiedener *C. jejuni*-Stämme als Antigen (*C. jejuni* 5646, 5647, OH 4382, OH 4384 und HB 93-13) konnten jeweils ähnliche Proliferationswerte beobachtet werden, entsprechend einer Kreuzreaktivität mit allen getesteten *C. jejuni*-Stämmen. Eine Kreuzerkennung bakterieller Antigene von *Salmonella typhimurium* (entspricht in den folgenden Tabellen Nr. 5700) konnte ausgeschlossen werden.

Zum gleichen Ergebnis kommt man bei der Untersuchung von GBS-Patientenzellen. Auf gleichem Weg wie bei den gesunden Donoren wurden aus dem Blut einer GBS-Patientin Zellen gewonnen und *C. jejuni*-spezifische T-Zell-Linien etabliert (Tabelle 2.12). Wie bei den *C. jejuni*-spezifischen T-Zell-Linien gesunder Spender wurden alle getesteten *C. jejuni*-Stämme (*C. jejuni* 5646, 5647, OH 4382, OH 4384 und HB 93-13), jedoch nicht *Salmonella typhimurium* (entspricht in den folgenden Tabellen Nr. 5700) kreuzerkannt.

*Tabelle 2.9: Reaktivität der gegen C. jejuni HB 93-13 generierten T-Zell-Linien von Donor SJ. Die T-Zellen wurden in Anwesenheit frischer bestrahlter autologer PBL ohne Antigen, mit PHA (5 µg/ml) oder mit den angegebenen Bakterien-Antigenen in einer Konzentration von 10 µg/ml stimuliert und über drei Tage kultiviert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Triplikatkulturen und geben den [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in die Zellen an. Kursiv ist die Standardabweichung SD angegeben.*

Zell-Linie	verwendete Antigene								
	ohne	PHA	5646	5647	PG 836	OH 4382	OH 4384	HB 93-13	5700
SJ-2	44 <i>9</i>	6820 <i>776</i>	15145 <i>2723</i>	12473 <i>445</i>	16392 <i>1975</i>	8441 <i>1734</i>	10916 <i>1386</i>	15762 <i>567</i>	76 <i>20</i>
SJ-3	671 <i>348</i>	13358 <i>492</i>	9577 <i>505</i>	6847 <i>386</i>	9265 <i>358</i>	7167 <i>229</i>	10611 <i>293</i>	4125 <i>277</i>	1427 <i>180</i>
SJ-4	552 <i>43</i>	29473 <i>524</i>	15846 <i>1044</i>	11160 <i>1434</i>	9937 <i>768</i>	4060 <i>196</i>	14953 <i>690</i>	11341 <i>455</i>	218 <i>93</i>
SJ-8	655 <i>140</i>	17558 <i>347</i>	15027 <i>408</i>	15073 <i>253</i>	16851 <i>1102</i>	11288 <i>227</i>	15998 <i>655</i>	7375 <i>361</i>	1853 <i>521</i>
SJ-9	1316 <i>671</i>	24933 <i>1662</i>	27806 <i>3350</i>	25949 <i>1592</i>	29702 <i>2626</i>	20806 <i>1171</i>	27542 <i>1581</i>	15139 <i>1005</i>	2915 <i>503</i>

*Tabelle 2.10: Reaktivität der gegen C. jejuni HB 93-13 generierten T-Zell-Linien von Donor NK.  
Kursiv ist die Standardabweichung SD angegeben.*

Zell-Linie	verwendete Antigene								
	ohne	PHA	5646	5647	PG 836	OH 4382	OH 4384	HB 93-13	5700
NK-2	224 <i>109</i>	35209 <i>2128</i>	53222 <i>389</i>	61073 <i>3932</i>	67014 <i>3329</i>	54113 <i>1863</i>	60473 <i>1406</i>	32369 <i>3339</i>	475 <i>97</i>
NK-3	265 <i>139</i>	28129 <i>953</i>	29380 <i>1897</i>	34985 <i>5685</i>	43642 <i>1446</i>	32783 <i>2449</i>	36069 <i>2388</i>	15292 <i>2042</i>	228 <i>124</i>
NK-5	189 <i>85</i>	26678 <i>1287</i>	25808 <i>705</i>	22634 <i>485</i>	29941 <i>1369</i>	24098 <i>837</i>	28771 <i>1079</i>	16499 <i>1832</i>	460 <i>126</i>
NK-6	83 <i>38</i>	20569 <i>407</i>	5079 <i>326</i>	7641 <i>796</i>	37158 <i>550</i>	5456 <i>455</i>	6781 <i>739</i>	12220 <i>1850</i>	324 <i>105</i>
NK-8	58 <i>5</i>	20136 <i>1239</i>	10624 <i>1213</i>	2639 <i>996</i>	9167 <i>1571</i>	2009 <i>349</i>	23 <i>9</i>	10292 <i>882</i>	49 <i>18</i>
NK-10	295 <i>186</i>	28812 <i>1000</i>	23942 <i>1179</i>	28692 <i>1658</i>	9118 <i>2600</i>	11536 <i>2428</i>	19068 <i>0</i>	26495 <i>1773</i>	73 <i>61</i>
NK-11	719 <i>121</i>	20176 <i>1381</i>	3362 <i>474</i>	619 <i>166</i>	9030 <i>269</i>	433 <i>90</i>	238 <i>26</i>	1425 <i>288</i>	251 <i>70</i>
NK-12	274 <i>65</i>	21339 <i>1133</i>	4825 <i>277</i>	4386 <i>134</i>	29932 <i>1758</i>	4399 <i>551</i>	805 <i>138</i>	19613 <i>372</i>	1261 <i>169</i>
NK-13	350 <i>86</i>	32825 <i>1418</i>	27602 <i>579</i>	22958 <i>1197</i>	26131 <i>1407</i>	22661 <i>219</i>	5855 <i>671</i>	25257 <i>540</i>	1136 <i>162</i>
NK-15	427 <i>140</i>	8170 <i>649</i>	3865 <i>190</i>	3609 <i>384</i>	22482 <i>1223</i>	4317 <i>576</i>	3204 <i>115</i>	15467 <i>420</i>	666 <i>146</i>
NK-17	1872 <i>358</i>	29987 <i>1714</i>	37543 <i>1362</i>	38497 <i>3320</i>	40872 <i>1205</i>	30165 <i>1300</i>	34118 <i>6736</i>	28574 <i>2059</i>	827 <i>214</i>
NK-18	146 <i>71</i>	29916 <i>482</i>	1285 <i>254</i>	1040 <i>415</i>	3703 <i>242</i>	954 <i>400</i>	61 <i>26</i>	940 <i>248</i>	923 <i>208</i>
NK-19	1676 <i>135</i>	15489 <i>506</i>	17967 <i>1972</i>	13515 <i>4399</i>	32961 <i>1617</i>	14033 <i>378</i>	15339 <i>4372</i>	21568 <i>491</i>	2573 <i>369</i>

Tabelle 2.11: Reaktivität der gegen *C. jejuni* HB 93-13 generierten T-Zell-Linien der Donoren RL, SS, GF und TL. Kursiv ist die Standarabweichung SD angegeben.

Zell-Linie	verwendete Antigene								
	ohne	PHA	5646	5647	PG 836	OH 4382	OH 4384	HB 93-13	5700
RL-3	75 <i>30</i>	19160 <i>4041</i>	49824 <i>1089</i>	75597 <i>3298</i>	153 <i>7</i>	54110 <i>1518</i>	83003 <i>3365</i>	27468 <i>472</i>	194 <i>35</i>
RL-8	245 <i>58</i>	25164 <i>2325</i>	59666 <i>6665</i>	62292 <i>836</i>	141 <i>27</i>	39437 <i>1125</i>	63720 <i>3016</i>	52581 <i>4766</i>	1621 <i>66</i>
SS-1	314 <i>120</i>	70628 <i>2068</i>	61398 <i>251</i>	58588 <i>1592</i>	49759 <i>109</i>	32085 <i>3430</i>	38816 <i>1358</i>	22797 <i>188</i>	1449 <i>138</i>
SS-2	361 <i>22</i>	14287 <i>472</i>	29060 <i>1548</i>	27852 <i>3767</i>	21935 <i>1922</i>	10985 <i>2125</i>	15916 <i>1874</i>	9649 <i>211</i>	255 <i>29</i>
SS-3	241 <i>42</i>	28384 <i>5594</i>	46290 <i>699</i>	33807 <i>830</i>	46730 <i>2138</i>	18231 <i>1402</i>	23266 <i>3326</i>	25457 <i>1432</i>	434 <i>138</i>
SS-5	153 <i>35</i>	31158 <i>3391</i>	49136 <i>4831</i>	42711 <i>1388</i>	46644 <i>2947</i>	32074 <i>3392</i>	46413 <i>1267</i>	30886 <i>2837</i>	74 <i>17</i>
GF-1	116 <i>7</i>	23103 <i>1870</i>	35624 <i>1259</i>	43530 <i>756</i>	42026 <i>1371</i>	21532 <i>1882</i>	35703 <i>178</i>	27765 <i>513</i>	94 <i>25</i>
GF-2	64 <i>30</i>	15831 <i>819</i>	19554 <i>2329</i>	23783 <i>379</i>	22686 <i>2142</i>	10593 <i>236</i>	19921 <i>1419</i>	12362 <i>466</i>	71 <i>11</i>
GF-3	216 <i>60</i>	19456 <i>1959</i>	17789 <i>1021</i>	18749 <i>270</i>	22318 <i>582</i>	10397 <i>590</i>	23356 <i>867</i>	10917 <i>1321</i>	385 <i>69</i>
TL-2	576 <i>134</i>	39107 <i>705</i>	34091 <i>1322</i>	34591 <i>871</i>	36407 <i>832</i>	21921 <i>1046</i>	36897 <i>3111</i>	23497 <i>983</i>	266 <i>29</i>
TL-4	215 <i>53</i>	23501 <i>1145</i>	4629 <i>254</i>	3196 <i>303</i>	2865 <i>393</i>	2285 <i>348</i>	3670 <i>725</i>	1797 <i>131</i>	100 <i>7</i>

Tabelle 2.12: Reaktivität der gegen *C. jejuni* HB 93-13 generierten T-Zell-Linien von Donor VR. Kursiv ist die Standarabweichung SD angegeben.

Zell-Linie	verwendete Antigene								
	ohne	PHA	5646	5647	PG 836	OH 4382	OH 4384	HB 93-13	5700
VR-C6	503 <i>185</i>	39898 <i>1259</i>	33513 <i>763</i>	45714 <i>3678</i>	42192 <i>2644</i>	28779 <i>609</i>	45478 <i>1277</i>	26354 <i>1970</i>	268 <i>62</i>
VR-E6	458 <i>147</i>	9122 <i>238</i>	10619 <i>1109</i>	14976 <i>316</i>	12602 <i>1529</i>	5052 <i>114</i>	9363 <i>494</i>	2735 <i>133</i>	267 <i>43</i>
VR-E9	448 <i>85</i>	15226 <i>3137</i>	22741 <i>715</i>	19823 <i>1290</i>	26263 <i>1708</i>	14767 <i>400</i>	27506 <i>889</i>	12269 <i>102</i>	448 <i>116</i>



### 2.7.2 Zelluläre Immunantwort gegen *C. jejuni*-Protein und *C. jejuni*-LPS

Zur Differenzierung, ob die *C. jejuni*-spezifischen T-Zellen *C. jejuni*-Protein oder *C. jejuni*-LPS erkennen, wurden zwei verschiedene LPS-Präparationen verwendet. Zum einen die nach 4.4.4 aufgereinigte LPS-Präparation. Zum anderen wurde, um Protein-Epitope aus dem aufgereinigten LPS zu entfernen, das nach 4.4.4 aufgereinigte LPS mit der Protease Pronase K verdaut (siehe 4.4.5). Im Proliferationsassay wurden beide LPS-Präparationen verwendet, wobei bei allen *C. jejuni*-spezifischen T-Zell-Linien mit unverdaulichem LPS eine ähnliche Aktivierung wie mit Natriumazid-inaktiviertem Gesamthomogenat erzielt werden konnte. Das heißt, dass in der unverdaulichen LPS-Präparation noch viele Protein-Epitope vorhanden waren, denn im Vergleich dazu wurden die Zellen durch Zugabe von Pronase K-verdaulichem LPS nicht oder nur gering stimuliert. Durch den Pronase-Verdau wurden alle Protein-Epitope entfernt, so dass durch das reine LPS keine oder nur eine sehr schwache Stimulation der Zellen stattfand. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.13, Tabelle 2.14 und Tabelle 2.15 zusammengefasst. Das gleiche Ergebnis ergab sich für die von der GBS-Patientin VR stammende Zell-Linie C6 (Tabelle 2.16). Die beiden anderen VR-Zell-Linien wurden nicht getestet.

Tabelle 2.13: Proteinreaktivität der gegen *C. jejuni* HB 93-13 generierten T-Zell-Linien von Donor NK mit *C. jejuni* HB 93-13-Antigenen. Die T-Zellen wurden mit den angegebenen Bakterien-Antigenen in einer Konzentration von 5 µg/ml stimuliert und über drei Tage kultiviert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten und geben den [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in die Zellen an. Kursiv ist die Standardabweichung SD angegeben.

Zell-Linie	verwendete Antigene			
	ohne	HB 93-13	HB 93-13 LPS	HB 93-13 LPS – Pronase-verdaut
NK-2	224 <i>109</i>	<b>56702</b> <i>636</i>	<b>54486</b> <i>1597</i>	99 <i>38</i>
NK-3	265 <i>139</i>	<b>34428</b> <i>1683</i>	<b>22182</b> <i>2289</i>	<b>756</b> <i>368</i>
NK-5	189 <i>85</i>	<b>28197</b> <i>820</i>	<b>22342</b> <i>1474</i>	278 <i>20</i>
NK-6	83 <i>38</i>	<b>20076</b> <i>1115</i>	<b>2507</b> <i>361</i>	44 <i>7</i>
NK-8	58 <i>5</i>	<b>7696</b> <i>1651</i>	<b>466</b> <i>136</i>	76 <i>21</i>
NK-10	295 <i>186</i>	<b>25178</b> <i>370</i>	<b>5327</b> <i>851</i>	28 <i>8</i>
NK-11	719 <i>121</i>	<b>1425</b> <i>288</i>	162 <i>30</i>	71 <i>16</i>
NK-12	274 <i>65</i>	<b>14612</b> <i>273</i>	<b>1571</b> <i>255</i>	67 <i>19</i>
NK-13	350 <i>86</i>	<b>23677</b> <i>610</i>	<b>13995</b> <i>1413</i>	93 <i>26</i>
NK-15	427 <i>140</i>	<b>16266</b> <i>1102</i>	<b>2016</b> <i>318</i>	231 <i>52</i>
NK-17	1873 <i>358</i>	<b>30003</b> <i>6445</i>	<b>38508</b> <i>1901</i>	379 <i>61</i>
NK-18	146 <i>71</i>	<b>1107</b> <i>222</i>	384 <i>38</i>	129 <i>64</i>
NK-19	1676 <i>135</i>	<b>28526</b> <i>4043</i>	<b>8325</b> <i>1392</i>	1089 <i>214</i>

Tabelle 2.14: Proteinreaktivität der gegen *C. jejuni* HB 93-13 generierten T-Zell-Linien von Donor SJ mit *C. jejuni* HB 93-13-Antigenen. Kursiv ist die Standarabweichung SD angegeben.

Zell-Linie	verwendete Antigene			
	ohne	HB 93-13	HB 93-13 LPS	HB 93-13 LPS – Pronase-verdaut
SJ-2	136 <i>26</i>	<b>11338</b> <i>203</i>	<b>8356</b> <i>256</i>	81 <i>24</i>
SJ-3	671 <i>348</i>	<b>7283</b> <i>521</i>	<b>11093</b> <i>455</i>	549 <i>192</i>
SJ-4	982 <i>375</i>	<b>5615</b> <i>1046</i>	<b>6827</b> <i>2247</i>	1456 <i>355</i>
SJ-8	655 <i>140</i>	<b>11623</b> <i>345</i>	<b>21446</b> <i>1340</i>	924 <i>142</i>
SJ-9	1316 <i>671</i>	<b>23025</b> <i>1869</i>	<b>34348</b> <i>2637</i>	1167 <i>443</i>

Tabelle 2.15: Proteinreaktivität der gegen *C. jejuni* HB 93-13 generierten T-Zell-Linien der Donoren RL, SS, GF und TL mit *C. jejuni* HB 93-13-Antigenen. Kursiv ist die Standarabweichung SD angegeben.

Zell-Linie	verwendete Antigene			
	ohne	HB 93-13	HB 93-13 LPS	HB 93-13 LPS – Pronase-verdaut
RL-3	75 <i>30</i>	<b>63127</b> <i>3276</i>	<b>58001</b> <i>5298</i>	181 <i>44</i>
RL-8	245 <i>58</i>	<b>52409</b> <i>4424</i>	<b>63383</b> <i>2458</i>	542 <i>131</i>
SS-1	314 <i>120</i>	<b>35917</b> <i>2967</i>	<b>42484</b> <i>1305</i>	<b>979</b> <i>293</i>
SS-2	361 <i>22</i>	<b>10630</b> <i>530</i>	<b>15408</b> <i>2720</i>	<b>1217</b> <i>311</i>
SS-3	30 <i>7</i>	<b>2218</b> <i>90</i>	<b>3809</b> <i>718</i>	34 <i>6</i>
SS-5	153 <i>35</i>	<b>32198</b> <i>4379</i>	<b>39407</b> <i>1610</i>	170 <i>70</i>
GF-1	116 <i>7</i>	<b>27591</b> <i>1363</i>	<b>21857</b> <i>2097</i>	<b>493</b> <i>60</i>
GF-2	64 <i>30</i>	<b>12934</b> <i>1689</i>	<b>13540</b> <i>716</i>	88 <i>20</i>
GF-3	216 <i>60</i>	<b>14179</b> <i>822</i>	<b>5006</b> <i>1027</i>	125 <i>42</i>
TL-2	576 <i>134</i>	<b>24946</b> <i>1063</i>	<b>31936</b> <i>3121</i>	557 <i>47</i>
TL-4	215 <i>53</i>	<b>1100</b> <i>299</i>	<b>769</b> <i>311</i>	189 <i>59</i>

Tabelle 2.16: Proteinreaktivität der gegen *C. jejuni* HB 93-13 generierten T-Zell-Linien von Donor VR mit *C. jejuni* HB 93-13-Antigenen. Kursiv ist die Standardabweichung SD angegeben.

Zell-Linie	verwendete Antigene			
	ohne	HB 93-13	HB 93-13 LPS	HB 93-13 LPS – Pronase-verdaut
VR-C6	503 <i>185</i>	<b>26354</b> <i>1970</i>	<b>26870</b> <i>1699</i>	376 <i>33</i>

Um zu zeigen, dass verdautes *C. jejuni*-LPS in den eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch wirkt und so zu einem schlechten Wachstum der T-Zellen führt, wurde mit humanen Zellen ein Toxizitätstest durchgeführt (Tabelle 2.17). Es ist erkennbar, dass bei Zugabe von PHA das Wachstum der Zellen auch durch hohe Konzentrationen von Pronase-verdaulichem *C. jejuni* HB 93-13 LPS nicht gehemmt wurde. Somit ist keine Toxizität in den eingesetzten Konzentrationen vorhanden.

Tabelle 2.17: Untersuchung einer möglichen Toxizität von verdaulichem *C. jejuni* HB 93-13 LPS mit humanen PBLs.

Es wurden Dreifachansätze mit verschiedenen Mengen LPS, jeweils mit und ohne PHA (5 µg/ml) angesetzt, nach 48 h mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin radioaktiv markiert und nach weiteren 16 h die partiell radioaktiv markierte DNS bestimmt. Kursiv ist die Standardabweichung SD angegeben.

HB 93-13-LPS verdaut	mit PHA	ohne PHA
40 µg/ml	60070 <i>2359</i>	212 <i>20</i>
20 µg/ml	56478 <i>4328</i>	174 <i>45</i>
5 µg/ml	56043 <i>3225</i>	n.u.
1 µg/ml	58066 <i>4104</i>	197 <i>61</i>
0,3 µg/ml	55573 <i>147</i>	237 <i>35</i>
0,1 µg/ml	49793 <i>77</i>	99 <i>29</i>
0,03 µg/ml	44636 <i>1791</i>	122 <i>6</i>
0 µg/ml	50915 <i>332</i>	73 <i>33</i>

---

### 2.7.3 Kreuzreaktivität *C. jejuni*-spezifischer T-Zell-Linien mit Myelinantigenen

Für die Untersuchung einer möglichen Kreuzreaktivität der *C. jejuni*-spezifischen T-Zellen mit Antigenen des Myelins peripherer Nerven, wurden die humanen rekombinant hergestellten Proteine P0 und P2, wie auch humanes MBP eingesetzt. Desweiteren mit bovinem Ursprung BPM, BCM, SE und P2 sowie Ratten- und Meerschweinchen-MBP. Eine Übersicht in Tabelle 2.18 zeigt, dass im Proliferationsassay drei der Linien von Donor NK mit humanem rekombinatem P2 kreuzreagieren. Gegen alle anderen eingesetzten Myelin-Antigene konnte keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden. Ebenso konnte bei den übrigen T-Zell-Linien keine Kreuzreaktivität mit Myelin-Antigenen nachgewiesen werden (Tabelle 2.19 und Tabelle 2.20). Ebenfalls keine Kreuzreaktivität mit Myelin-Antigenen zeigt die GBS-Patientenlinie VR-C6 (Tabelle 2.21).

Tabelle 2.18: *Reaktivität der gegen C. jejuni HB 93-13 spezifischen T-Zell-Linien von Donor NK mit verschiedenen Myelin-Antigenen.*

*Die T-Zellen wurden in Anwesenheit frischer bestrahlter autologer PBL und mit den angegebenen Antigenen in folgenden Konzentration stimuliert und über drei Tage kultiviert: hum rek P2- und P0-Proteine sowie C. jejuni HB 93-13 je 10 µg/ml, hum MBP 20 µg/ml und BPM 100 µg/ml. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten und geben den [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in die Zellen an. Kursiv ist die Standardabweichung SD angegeben.*

Zell-Linie	verwendete Antigene					
	ohne	hum rek P2	hum rek P0	hum MBP	BPM	HB 93-13
NK-2	833 <i>186</i>	155 <i>110</i>	76 <i>14</i>	499 <i>58</i>	422 <i>174</i>	<b>28659</b> <i>212</i>
NK-3	85 <i>13</i>	<b>4621</b> <i>406</i>	75 <i>33</i>	70 <i>24</i>	78 <i>11</i>	<b>9233</b> <i>210</i>
NK-5	381 <i>126</i>	180 <i>75</i>	99 <i>44</i>	333 <i>127</i>	335 <i>186</i>	<b>20919</b> <i>429</i>
NK-6	70 <i>21</i>	79 <i>17</i>	42 <i>27</i>	85 <i>55</i>	71 <i>22</i>	<b>2118</b> <i>150</i>
NK-8	58 <i>5</i>	103 <i>29</i>	67 <i>18</i>	90 <i>44</i>	59 <i>30</i>	<b>10292</b> <i>882</i>
NK-10	295 <i>156</i>	32 <i>12</i>	35 <i>21</i>	230 <i>58</i>	173 <i>120</i>	<b>26495</b> <i>1773</i>
NK-11	719 <i>120</i>	134 <i>36</i>	78 <i>34</i>	476 <i>22</i>	405 <i>106</i>	<b>1425</b> <i>288</i>
NK-12	274 <i>65</i>	193 <i>139</i>	90 <i>45</i>	146 <i>53</i>	241 <i>127</i>	<b>19613</b> <i>372</i>
NK-13	350 <i>86</i>	<b>6851</b> <i>745</i>	115 <i>9</i>	163 <i>105</i>	206 <i>150</i>	<b>25257</b> <i>540</i>
NK-15	427 <i>140</i>	441 <i>107</i>	378 <i>68</i>	255 <i>68</i>	316 <i>53</i>	<b>15467</b> <i>420</i>
NK-17	1872 <i>358</i>	679 <i>167</i>	848 <i>159</i>	2290 <i>640</i>	1193 <i>427</i>	<b>28574</b> <i>2060</i>
NK-18	357 <i>75</i>	168 <i>45</i>	130 <i>17</i>	378 <i>95</i>	189 <i>58</i>	<b>36137</b> <i>1253</i>
NK-19	1676 <i>135</i>	<b>7717</b> <i>980</i>	1679 <i>180</i>	1747 <i>286</i>	1518 <i>226</i>	<b>21568</b> <i>491</i>

Tabelle 2.19: Reaktivität der gegen *C. jejuni* HB 93-13 spezifischen T-Zell-Linien von Donor SJ mit verschiedenen Myelin-Antigenen. Kursiv ist die Standarabweichung SD angegeben.

Zell-Linie	verwendete Antigene					
	ohne	hum rek P2	hum rek P0	hum MBP	BPM	HB 93-13
SJ-2	44 <i>9</i>	135 <i>79</i>	123 <i>33</i>	60 <i>6</i>	42 <i>6</i>	<b>15762</b> <i>567</i>
SJ-4	128 <i>45</i>	198 <i>36</i>	146 <i>27</i>	270 <i>73</i>	106 <i>13</i>	<b>6162</b> <i>339</i>
SJ-8	80 <i>35</i>	561 <i>238</i>	985 <i>295</i>	83 <i>22</i>	76 <i>41</i>	<b>10372</b> <i>554</i>
SJ-9	2811 <i>1105</i>	2410 <i>371</i>	3591 <i>1359</i>	1235 <i>391</i>	2029 <i>174</i>	<b>52624</b> <i>23341</i>

Tabelle 2.20: Reaktivität der gegen *C. jejuni* HB 93-13 spezifischen T-Zell-Linien der Donoren RL, SS, GF und TL mit verschiedenen Myelin-Antigenen. Kursiv ist die Standarabweichung SD angegeben.

Zell-Linie	verwendete Antigene					
	ohne	hum rek P2	hum rek P0	hum MBP	BPM	HB 93-13
RL-3	120 <i>28</i>	503 <i>60</i>	568 <i>208</i>	58 <i>6</i>	64 <i>20</i>	<b>18615</b> <i>1002</i>
RL-8	224 <i>40</i>	5421 <i>659</i>	2658 <i>895</i>	96 <i>28</i>	87 <i>45</i>	<b>35630</b> <i>1323</i>
SS-1	314 <i>120</i>	3316 <i>576</i>	1544 <i>312</i>	312 <i>65</i>	153 <i>28</i>	<b>22798</b> <i>188</i>
SS-2	362 <i>21</i>	517 <i>228</i>	868 <i>273</i>	166 <i>28</i>	218 <i>56</i>	<b>9650</b> <i>211</i>
SS-3	31 <i>7</i>	146 <i>68</i>	103 <i>49</i>	142 <i>50</i>	75 <i>44</i>	<b>2350</b> <i>377</i>
SS-5	154 <i>35</i>	168 <i>46</i>	213 <i>52</i>	180 <i>80</i>	95 <i>17</i>	<b>30887</b> <i>2837</i>
GF-1	116 <i>7</i>	913 <i>396</i>	328 <i>86</i>	264 <i>30</i>	176 <i>38</i>	<b>27766</b> <i>513</i>
GF-2	64 <i>29</i>	629 <i>396</i>	151 <i>56</i>	138 <i>64</i>	87 <i>21</i>	<b>12363</b> <i>466</i>
GF-3	217 <i>60</i>	1566 <i>525</i>	571 <i>159</i>	359 <i>66</i>	94 <i>6</i>	<b>10918</b> <i>1321</i>
TL-2	57 <i>20</i>	43 <i>21</i>	41 <i>10</i>	38 <i>21</i>	59 <i>30</i>	<b>13391</b> <i>1629</i>
TL-4	215 <i>53</i>	279 <i>118</i>	419 <i>28</i>	363 <i>63</i>	138 <i>29</i>	<b>1797</b> <i>130</i>

Tabelle 2.21: Reaktivität der gegen *C. jejuni* HB 93-13 spezifischen T-Zell-Linien von Donor VR mit verschiedenen Myelin-Antigenen. Kursiv ist die Standardabweichung SD angegeben.

Zell-Linie	verwendete Antigene					
	ohne	hum rek P2	hum rek P0	hum MBP	BPM	HB 93-13
VR-C6	503 <i>185</i>	335 <i>70</i>	393 <i>57</i>	575 <i>140</i>	373 <i>33</i>	<b>26354</b> <i>1970</i>

Die *C. jejuni*-spezifischen T-Zell-Linien NK-3 und NK-13, die mit humanem rekombinaten P2 kreuzreagierten, wurden zusätzlich auf ihre Reaktivität mit verschiedenen bovinen und humanen P2-Peptiden getestet. Des Weiteren wurde noch die Zell-Linie NK-18 zum Vergleich getestet. Nur mit dem bovinen P2-Peptiden 70-90 und 115-131 konnte bei der Zell-Linie NK-3 eine starke Reaktion ausgelöst werden (Tabelle 2.22).



Tabelle 2.22: Die drei Zell-Linien NK-3, NK-13 und NK-18 wurden auf ihre Reaktivität gegenüber verschiedenen bovinen und humanen P2-Peptiden getestet, wobei die Proteine in der Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt wurden. Als Vergleich wurden als Antigene HB 93-13 und humanes rekombinantes P2, jeweils in der Konzentration von 10 µg/ml, eingesetzt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten und geben den [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in die Zellen an. Kursiv ist die Standardabweichung SD angegeben.

verwendete Antigene	Zell-Linie NK-3	Zell-Linie NK-13	Zell-Linie NK-18
ohne	273 <i>39</i>	44 <i>6</i>	357 <i>85</i>
HB 93-13	<b>19383</b> <i>757</i>	<b>50174</b> <i>5052</i>	<b>36137</b> <i>1253</i>
P2	<b>25022</b> <i>420</i>	<b>36041</b> <i>2349</i>	169 <i>45</i>
P2-Peptide			
bov. 115-131	<b>3341</b> <i>203</i>	348 <i>75</i>	803 <i>75</i>
bov. 100-120	576 <i>74</i>	131 <i>25</i>	511 <i>196</i>
bov. 85-110	501 <i>137</i>	98 <i>12</i>	387 <i>134</i>
bov. 70-90	<b>10226</b> <i>187</i>	98 <i>17</i>	236 <i>19</i>
bov. 60-70	274 <i>80</i>	469 <i>289</i>	576 <i>101</i>
bov. 53-78	251 <i>21</i>	162 <i>36</i>	346 <i>95</i>
bov. 35-60	689 <i>104</i>	1312 <i>239</i>	791 <i>128</i>
bov. 20-40	563 <i>69</i>	1792 <i>119</i>	1472 <i>334</i>
bov.1-20	602 <i>77</i>	225 <i>164</i>	317 <i>57</i>
hum. 85-110	411 <i>27</i>	75 <i>27</i>	363 <i>93</i>
hum. 70-90	355 <i>30</i>	92 <i>26</i>	474 <i>223</i>
hum. 1-20	440 <i>75</i>	151 <i>49</i>	589 <i>150</i>

#### 2.7.4 *C. jejuni*-spezifische humane T-Zellen sind MHC-Klasse II restringiert

Wie schon zuvor erwähnt, spielen die MHC-Antigene eine wichtige Rolle bei der Immunreaktion, vor allem in der Antigenpräsentation. Deswegen wurden im Proliferationsassay MHC-Klasse II-spezifische Antikörper eingesetzt. Zeigt sich im Proliferationsassay dann ein vermindertes Wachstum, kann dadurch die HLA-Restriktion der Antigenerkennung identifiziert werden.

*C. jejuni*-spezifische Zell-Linien wurden mit frischen APCs, *C. jejuni*-Antigen und den MHC-Klasse II-spezifischen Antikörpern  $\alpha$ DP,  $\alpha$ DQ,  $\alpha$ DR, und  $\alpha$ DP,DQ,DR kultiviert. Es zeigte sich, dass bei allen Zell-Linien das Wachstums mit dem  $\alpha$ DR-Antikörper stärker als mit dem  $\alpha$ DP,DQ,DR-Antikörper blockierbar war. Mit den  $\alpha$ DP- und  $\alpha$ DQ-Antikörpern wurde das Wachstum nicht gehemmt. Dies bedeutet, dass das getestete *C. jejuni*-Antigen durch HLA-DR-Moleküle auf den APCs präsentiert wird (Tabelle 2.23, Tabelle 2.24, und Tabelle 2.25).

*Tabelle 2.23: C. jejuni-spezifische T-Zell-Linien von Donor SJ wurden auf ihre MHC-Klasse II-Restriktion getestet. Dazu wurden die T-Zellen mit frischen APCs ohne Antigen oder mit Gesamt-C. jejuni HB 93-13 (5 oder 1,25  $\mu$ g/ml) und  $\alpha$ DP-,  $\alpha$ DQ-,  $\alpha$ DR- oder einem  $\alpha$ DP,DQ,DR-Antikörper (je 3  $\mu$ g/ml) über drei Tage kultiviert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten und geben den [ $^3$ H]-Thymidin-Einbau in die Zellen an. Kursiv ist die Standardabweichung SD angegeben.*

Zell-Linie	verwendete Antigene					
	ohne	HB 93-13 + PBS	HB 93-13 + $\alpha$ DP	HB 93-13 + $\alpha$ DQ	HB 93-13 + $\alpha$ DR	HB 93-13 + $\alpha$ DP,DQ,DR
SJ-2	136 <i>26</i>	11338 <i>203</i>	7407 <i>193</i>	10164 <i>715</i>	<b>430</b> <i>234</i>	<b>165</b> <i>67</i>
SJ-3	671 <i>348</i>	7283 <i>521</i>	7598 <i>593</i>	6972 <i>634</i>	<b>1033</b> <i>247</i>	<b>759</b> <i>295</i>
SJ-4	982 <i>345</i>	5615 <i>1046</i>	2639 <i>458</i>	4254 <i>686</i>	<b>477</b> <i>113</i>	<b>433</b> <i>223</i>
SJ-8	655 <i>140</i>	11623 <i>345</i>	12609 <i>730</i>	11322 <i>341</i>	<b>10497</b> <i>102</i>	<b>2810</b> <i>579</i>
SJ-9	1316 <i>671</i>	23025 <i>1869</i>	24282 <i>777</i>	22062 <i>1674</i>	<b>12463</b> <i>924</i>	<b>19256</b> <i>445</i>

Tabelle 2.24: C. jejuni-spezifische T-Zell-Linien von Donor NK wurden auf ihre MHC-Klasse II-Restriktion getestet. Kursiv ist die Standardabweichung SD angegeben.

Zell-Linie	verwendete Antigene					
	ohne	HB 93-13 + PBS	HB 93-13 + $\alpha$ DP	HB 93-13 + $\alpha$ DQ	HB 93-13 + $\alpha$ DR	HB 93-13 + $\alpha$ DP,DQ,DR
NK-2	225 <i>109</i>	56702 <i>636</i>	59092 <i>2223</i>	58817 <i>1181</i>	<b>28938</b> <i>2322</i>	<b>30452</b> <i>2505</i>
NK-3	265 <i>139</i>	34428 <i>1683</i>	35760 <i>704</i>	34004 <i>522</i>	<b>8542</b> <i>1094</i>	<b>16667</b> <i>786</i>
NK-5	189 <i>85</i>	28197 <i>820</i>	26086 <i>1008</i>	25136 <i>376</i>	<b>4030</b> <i>857</i>	<b>9733</b> <i>873</i>
NK-6	83 <i>38</i>	20076 <i>1115</i>	22710 <i>358</i>	22153 <i>364</i>	<b>285</b> <i>116</i>	<b>955</b> <i>146</i>
NK-8	47 <i>7</i>	4303 <i>535</i>	2490 <i>158</i>	3452 <i>363</i>	<b>103</b> <i>18</i>	<b>169</b> <i>74</i>
NK-10	80 <i>11</i>	5022 <i>404</i>	5204 <i>2057</i>	4433 <i>320</i>	<b>1076</b> <i>163</i>	<b>3757</b> <i>49</i>
NK-11	152 <i>42</i>	1376 <i>240</i>	1508 <i>180</i>	1236 <i>67</i>	<b>116</b> <i>46</i>	<b>89</b> <i>20</i>
NK-12	274 <i>65</i>	12601 <i>1000</i>	15664 <i>1444</i>	15619 <i>1343</i>	<b>67</b> <i>2</i>	<b>693</b> <i>186</i>
NK-13	350 <i>86</i>	23678 <i>610</i>	27784 <i>1636</i>	24883 <i>1513</i>	<b>99</b> <i>6</i>	<b>828</b> <i>184</i>
NK-15	428 <i>139</i>	16266 <i>1102</i>	11505 <i>1010</i>	9827 <i>1901</i>	<b>216</b> <i>48</i>	<b>377</b> <i>43</i>
NK-17	1872 <i>358</i>	30002 <i>6445</i>	33110 <i>2293</i>	30670 <i>4071</i>	<b>7336</b> <i>1837</i>	<b>15969</b> <i>1342</i>
NK-18	146 <i>71</i>	1188 <i>335</i>	2027 <i>343</i>	1149 <i>568</i>	<b>65</b> <i>5</i>	<b>65</b> <i>4</i>
NK-19	1677 <i>135</i>	28527 <i>4043</i>	24036 <i>817</i>	23529 <i>1026</i>	<b>3430</b> <i>449</i>	<b>8689</b> <i>1080</i>

Tabelle 2.25: *C. jejuni*-spezifische T-Zell-Linien der Donoren RL, SS, GF und TL wurden auf ihre MHC-Klasse II-Restriktion getestet. Kursiv ist die Standardabweichung SD angegeben.

Zell-Linie	verwendete Antigene					
	ohne	HB 93-13 + PBS	HB 93-13 + $\alpha$ DP	HB 93-13 + $\alpha$ DQ	HB 93-13 + $\alpha$ DR	HB 93-13 + $\alpha$ DP,DQ,DR
RL-3	75 <i>30</i>	17293 <i>1195</i>	15185 <i>2020</i>	15354 <i>878</i>	<b>4172</b> <i>372</i>	<b>4998</b> <i>1232</i>
RL-8	245 <i>58</i>	48213 <i>3524</i>	46651 <i>1733</i>	62833 <i>653</i>	<b>4233</b> <i>523</i>	<b>13344</b> <i>1099</i>
SS-1	314 <i>120</i>	22492 <i>1598</i>	15978 <i>1606</i>	15275 <i>1555</i>	<b>442</b> <i>132</i>	<b>844</b> <i>355</i>
SS-2	361 <i>22</i>	14762 <i>3138</i>	15538 <i>1490</i>	12710 <i>1775</i>	<b>652</b> <i>344</i>	<b>4344</b> <i>674</i>
SS-3	30 <i>7</i>	2825 <i>356</i>	3319 <i>260</i>	3173 <i>432</i>	<b>42</b> <i>12</i>	<b>306</b> <i>23</i>
SS-5	153 <i>35</i>	33213 <i>2649</i>	32357 <i>1698</i>	29791 <i>2084</i>	<b>1542</b> <i>378</i>	<b>19269</b> <i>2843</i>
GF-1	116 <i>6</i>	22818 <i>3564</i>	17980 <i>960</i>	18739 <i>665</i>	<b>111</b> <i>17</i>	<b>148</b> <i>41</i>
GF-2	64 <i>29</i>	16698 <i>701</i>	13123 <i>689</i>	14066 <i>367</i>	<b>111</b> <i>51</i>	<b>295</b> <i>142</i>
GF-3	216 <i>60</i>	7645 <i>2276</i>	<b>2194</b> <i>253</i>	<b>4285</b> <i>1312</i>	<b>64</b> <i>14</i>	<b>77</b> <i>23</i>
TL-2	576 <i>134</i>	3689 <i>1214</i>	<b>1936</b> <i>533</i>	<b>2383</b> <i>333</i>	<b>343</b> <i>83</i>	<b>295</b> <i>45</i>
TL-4	522 <i>131</i>	21555 <i>696</i>	18058 <i>1368</i>	20609 <i>997</i>	<b>297</b> <i>63</i>	<b>209</b> <i>69</i>

Die Restriktion der *C. jejuni*-spezifischen T-Zellen VR-C6 und VR-E9 der GBS-Patientin (VR) ist im Vergleich zu den vorherigen gesunden Probanden besonders interessant. Es wird ersichtlich, dass bei Verwendung von autologen Antigenpräsentierenden Zellen die Blockade durch  $\alpha$ DR- und  $\alpha$ DP,DQ,DR-Antikörper wesentlich weniger ausgeprägt ist als bei den gesunden Probanden. Daher stellt sich die Frage, ob die Antigenerkennung in diesem Fall nicht über MHC-Klasse II-Moleküle verläuft, sondern über CD1-Moleküle. Um eine CD1-Restriktion auszuschließen, wurden die T-Zellen mit Antigen und den APCs der Donoren SH (DR 2/11) und RG

---

(DR 4) restimuliert. Da sich die CD1-Moleküle der verschiedenen Donoren nicht unterscheiden, müssen sich die T-Zellen bei CD1-Restriktion durch alle APCs gleichermaßen stimulieren lassen.

Es wurde deutlich, dass die Zell-Linien VR-C6 und VR-E9 eine erhebliche Alloreaktion gegen die fremden Spenderzellen zeigten. Diese hohen Werte ohne Antigen sind bei der Interpretation nach Zugabe der Antigene zu berücksichtigen. Es zeigte sich, dass die Zell-Linien C6 und E9 nicht CD1-restringiert sind, da durch Zugabe von APCs der Donoren SH oder RG kein *C. jejuni*-spezifisches Wachstum erzielt werden konnte, also die APCs beider Spender das *C. jejuni* HB 93-13-Antigen nicht präsentierten.

Bei der Zell-Linie VR-E6 wurde im Falle der *C. jejuni* HB 93-13-Antigen-Präsentation durch die APCs des Donors SH (HLA-DR 2/11) zwar spezifische Proliferation festgestellt, eine CD1-Restriktion ist jedoch wegen der Suppressierbarkeit durch Antikörper gegen HLA-DQ, -DR und -DR,DP,DQ, sowie der fehlenden *C. jejuni*-Präsentation durch die APC von RG (HLA-DR 4/4) unwahrscheinlich. Jedoch besteht wahrscheinlich eine partielle HLA-Identität in -DR und -DQ zwischen der Patientin VR und dem APC-Donor SH und benutzt die Linie E6, im Gegensatz zu den Linien C6 und E9, diese als Restriktionselemente.

Die sehr starke Stimulation mit PHA, auch ohne zugesetzte APCs, wird wahrscheinlich durch das Vorhandensein residueller APCs hervorgerufen.

Tabelle 2.26: *C. jejuni*-spezifische T-Zell-Linien von Donor VR wurden auf ihre MHC-Klasse II-Restriktion getestet. Dazu wurden die T-Zellen mit frischen APCs ohne Antigen, mit PHA (5 µg/ml) oder mit Gesamt-*C. jejuni* HB 93-13 (1,25 µg/ml) und αDP-, αDQ-, αDR- oder einem αDP,DQ,DR-Antikörper (je 3 µg/ml) über drei Tage kultiviert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten und geben den [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in die Zellen an. Zusätzlich wurden anstatt der autologen APCs (VR) noch APCs der Donoren SH und RG eingesetzt. Kursiv ist die Standarabweichung SD angegeben.

APC	VR-C6				VR-E6				VR-E9			
	ohne	VR	SH	RG	ohne	VR	SH	RG	ohne	VR	SH	RG
Antigen												
ohne	629 <i>87</i>	558 <i>71</i>	1769 <i>321</i>	4010 <i>157</i>	88 <i>24</i>	353 <i>33</i>	356 <i>60</i>	772 <i>39</i>	1641 <i>318</i>	2518 <i>103</i>	2974 <i>537</i>	3656 <i>312</i>
PHA	1715 <i>138</i>	45490 <i>3674</i>	39319 <i>1562</i>	40918 <i>888</i>	2334 <i>248</i>	21778 <i>1775</i>	20572 <i>2120</i>	24495 <i>664</i>	10700 <i>929</i>	35330 <i>3918</i>	28570 <i>953</i>	34499 <i>2773</i>
HB 93-13	597 <i>44</i>	<b>10916</b> <i>2530</i>	505 <i>233</i>	4017 <i>1107</i>	68 <i>19</i>	<b>3895</b> <i>352</i>	<b>3169</b> <i>86</i>	1009 <i>147</i>	1576 <i>144</i>	<b>7917</b> <i>583</i>	665 <i>110</i>	3286 <i>606</i>
+ αDP	n.u. <i>1108</i>	<b>7526</b> <i>208</i>	527 <i>484</i>	4514 <i>484</i>	n.u. <i>369</i>	<b>3128</b> <i>165</i>	<b>2294</b> <i>106</i>	1012 <i>106</i>	n.u. <i>758</i>	<b>4172</b> <i>62</i>	578 <i>62</i>	4587 <i>623</i>
+ αDQ	n.u. <i>198</i>	5319 <i>101</i>	406 <i>697</i>	4036 <i>697</i>	n.u. <i>931</i>	2438 <i>20</i>	328 <i>50</i>	1049 <i>50</i>	n.u. <i>752</i>	<b>3736</b> <i>41</i>	399 <i>705</i>	4022 <i>705</i>
+ αDR	n.u. <i>323</i>	3125 <i>62</i>	234 <i>158</i>	952 <i>158</i>	n.u. <i>76</i>	280 <i>44</i>	275 <i>55</i>	867 <i>55</i>	n.u. <i>91</i>	1346 <i>40</i>	805 <i>238</i>	2485 <i>238</i>
+ αDP, DQ,DR	n.u. <i>754</i>	4411 <i>14</i>	172 <i>260</i>	1432 <i>260</i>	n.u. <i>81</i>	544 <i>55</i>	290 <i>55</i>	869 <i>55</i>	n.u. <i>336</i>	1194 <i>118</i>	670 <i>831</i>	1522 <i>831</i>

### 2.7.5 *C. jejuni*-spezifische T-Zell-Linie NK-3 ist HLA-DR-11 restringiert

Da der HLA-DR-Haplotyp des Donors NK mit den Allelen 1 und 11 bekannt war, stellte sich die Frage, ob die gemäß Antikörper-Inhibierungstest (Tabelle 2.24) HLA-DR-restringierte Zell-Linie NK-3 HLA-DR-1 oder HLA-DR-11 restringiert ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Zellen im Proliferationsassay nicht nur mit autologen APCs stimuliert, sondern auch mit den APCs anderer Donoren, die mit Donor NK in jeweils einem HLA-DR-Allel übereinstimmen.

Als Kontrolle wurden die T-Zellen zwar mit Antigen kultiviert, jedoch keine APCs zugefügt, was zu keinem Wachstum der Zellen führte und damit einen unspezifischen mitogenen Effekt der Antigenpräparation ausschloß. Außerdem wurden auch autologe APCs ohne T-Zellen inkubiert, was ebenfalls keine Proliferation induzierte. Wie häufig beobachtet, konnte mit PHA zwar ein Wachstum der bestrahlten APCs erzielt werden, das jedoch deutlich unter dem mit T-Zellen lag ( $p < 0,01$ ). Die mit autologen APCs

stimulierten T-Zellen zeigten mit allen eingesetzten Antigenen ein starkes Wachstum, die Kreuzreaktivität der *C. jejuni*-spezifischen T-Zellen mit rekombinantem humanem P2 wurde bestätigt. Ein genauso starkes Wachstum zeigten die T-Zellen in Anwesenheit von APCs von Donor SH, ebenfalls mit allen eingesetzten Antigenen. Dies indiziert, dass sowohl die Erkennung von *C. jejuni*-Antigen, als auch die Kreuzerkennung von P2, HLA-DR 11 restringiert sind. Wurden dagegen APCs des Donors JZ im Assay verwendet, konnte lediglich mit dem Mitogen PHA ein Wachstum erzielt werden (Bild 2.9).

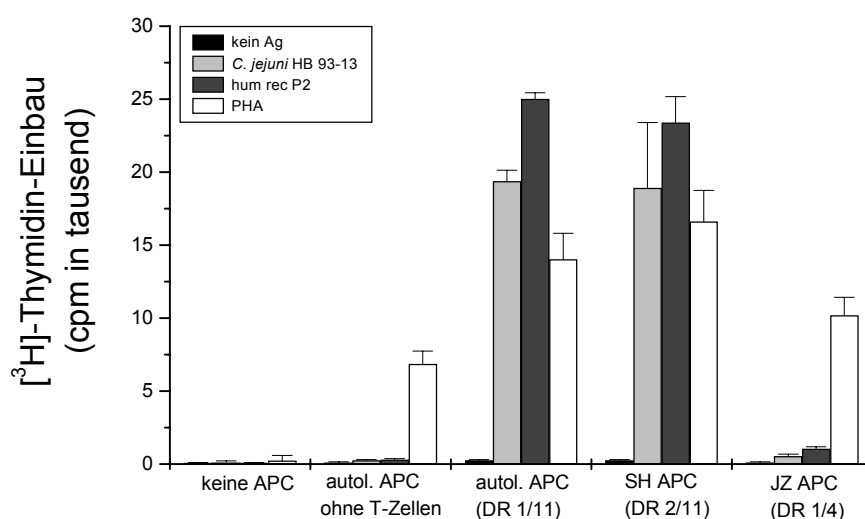


Bild 2.9: Die *C. jejuni*-spezifische T-Zell-Linie NK-3 reagiert sowohl bei Präsenz autologer APCs (DR 1/11) als auch bei APCs des DR 2/11 exprimierenden Donors SH gegen *C. jejuni*- und P2-Antigen.

Die Zellen wurden mit den angegebenen Antigenen in den folgenden Konzentrationen für drei Tage kultiviert: *C. jejuni* HB 93-13 10 µg/ml, humanes rekombinantes P2 10 µg/ml und PHA 5 µg/ml. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Triplikatkulturen und geben den [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in die Zellen an.

### 2.7.6 Phänotyp *C. jejuni*-spezifischer humaner T-Zellen

Um den Phänotyp der *C. jejuni*-spezifischen humanen Zell-Linien zu bestimmen, wurden die Oberflächenantigene immunfluoreszenzgefärbt und mittels durchflußzytometrischer FACS-Analyse bestimmt.

Die untersuchten humanen Zell-Linien zeigten alle das gleiche Ergebnis. Sie tragen  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptoren und sind vom Phänotyp CD 4<sup>+</sup>/CD 8<sup>-</sup>. Die Ergebnisse für die T-Zell-Linien NK-3 ist in Bild 2.10 dargestellt.

Die Ergebnisse der übrigen untersuchten Zell-Linien sind tabellarisch in Tabelle 2.27 zusammengefaßt.

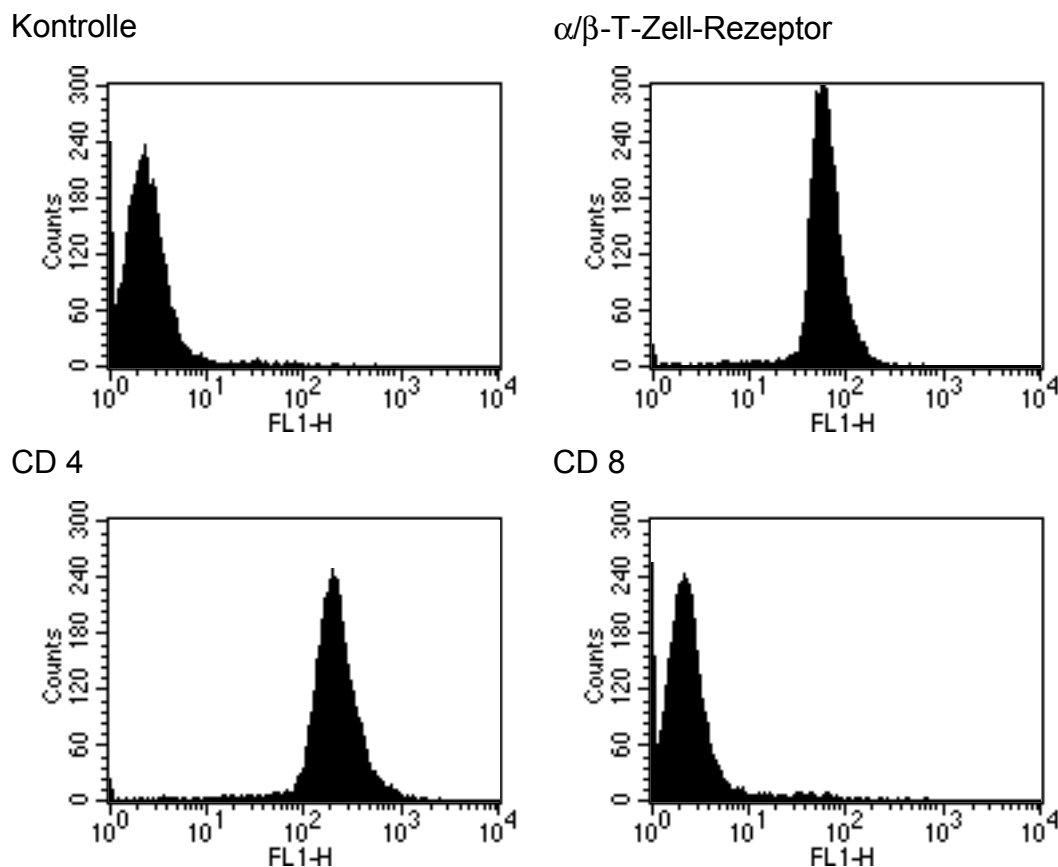


Bild 2.10: Die humane *C. jejuni*-spezifische T-Zell-Linie NK-3 ist  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptor positiv und vom Phänotyp CD 4<sup>+</sup>/CD 8<sup>-</sup>.

Die Zellen wurden mit den FITC-konjugierten Antikörpern gegen  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptor, CD 4 und CD 8 inkubiert und anschließend vermessen. Alle Zellen die eine höhere Fluoreszenz als  $10^1$  zeigen, reagieren positiv ( $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptor, CD 4).



*Tabelle 2.27: Übersicht über die Untersuchungen zum Phänotyp der humanen C. jejuni-spezifischen T-Zell-Linien.  
 Angegeben ist der Prozentsatz an Zellen innerhalb der Linienpopulation, welcher mit den jeweils genannten Antikörpern angefärbt werden kann.*

Zell-Linie	IgG-Kontrolle	$\alpha/\beta$ -TCR	CD 4	CD 8
NK-3	1,8	98,6	99,0	3,3
NK-17	1,55	98,0	96,9	5,4
NK-19	6,9	89,6	92,4	7,5
GF-2	5,2	99,0	98,9	5,7
TL-2	5,0	97,3	91,3	11,6
VR-C6	4,3	98,2	94,7	11,1

## **3 Diskussion**

Die Experimente dieser Studie wurden durchgeführt, um eine mögliche pathogene Bedeutung einer *C. jejuni*-spezifischen Immunantwort bei der Entstehung akuter Immunneuropathien festzustellen.

Dies geschah auf zellulärer Ebene sowohl im Tiermodell des GBS, der EAN, als auch mit humanen T-Zellen. Auf humoraler Ebene wurden Antikörper gegen *C. jejuni*-LPS generiert, die im Modell der AT-EAN und in Makro-Patch-Clamp Untersuchungen an der neuromuskulären Endplatte des Mäusezwerchfells auf ihre funktionellen Eigenschaften getestet wurden.

Letztlich wurde die Antigen-unspezifische Modulation natürlicher Immuntoleranz durch *C. jejuni*-LPS untersucht.

### **3.1 Zelluläre Mechanismen**

#### **3.1.1 Aktive Immunisierung von Ratten mit *C. jejuni*-Antigen**

Eine aktiv induzierte EAN wird normalerweise durch die Immunisierung mit peripherem Myelin (Hughes et al. 1981) oder den Myelinproteinen P2 (Olee et al. 1990) oder P0 (Linnington et al. 1992) induziert und beruht auf der Aktivierung PNS-spezifischer T-Zellen. Entsprechend dem Konzept des molekularen Mimikry zwischen *C. jejuni* und Myelin, wurden Tiere mit verschiedenen *C. jejuni*-Antigenen immunisiert, wodurch eine EAN ausgelöst werden sollte. Durch die Immunisierung mit Gesamt-*C. jejuni* konnte jedoch keine EAN ausgelöst werden.

Da neben Lewis-Ratten auch DA-Ratten eine starke zelluläre Immunreaktion gegen Fremdartigen entwickeln und sich in früheren Versuchen suszeptibel für eine EAN zeigten (Gaupp et al. 1997b), wurden neben Lewis- auch DA-Ratten mit *C. jejuni*-Antigen immunisiert, um eine potentielle Kreuzreaktivität auch auf Basis einer zweiten MHC-Konstellation zu untersuchen. Jedoch zeigten sich auch hier keine Anzeichen einer EAN oder andere Krankheitszeichen.

Die *in vivo*-Ergebnisse bezüglich der Immunisierung mit hohen *C. jejuni*-Antigendosen sprechen nicht für eine Kreuzreaktivität der entsprechenden T-Zellen mit PNS-Antigenen.

Eine potentielle zelluläre Kreuzreaktivität ist maßgeblich durch MHC-Antigene bestimmt, die in der Ratte und im Menschen vollkommen unterschiedlich sind (Günther und Walter 2000). Mit den beiden Inzuchtstämmen der Lewis- und DA-Ratten sind zwar zwei verschiedene MHC-Konstellationen untersucht, es ist aber aufgrund der unterschiedlichen MHC-Antigene in Ratte und Mensch durchaus möglich, dass der MHC der Ratte in Bezug auf eine Untersuchung der Kreuzreaktivität gänzlich ungeeignet ist. Für eine immunvermittelte Neuritis dagegen handelt es sich bei der Ratte schon um ein geeignetes Modell, da im Gegensatz zur Maus die Induktion einer autoimmunen Neuritis leicht und in verschiedenen Stämmen gelingt. Die Ratte ist für diese Erkrankung suszeptibel.

### 3.1.2 Generierung von *C. jejuni*-spezifischen Ratten-T-Zellen

Da durch *C. jejuni*-Antigene keine EAN ausgelöst werden konnte, wurden *C. jejuni*-spezifische Ratten-T-Zell-Linien generiert, um eine mögliche Neuritogenität von *C. jejuni*-spezifischen T-Zellen zu untersuchen. Bei Primärstimulationen von Lymphozyten aus poplitealen Lymphknoten und der Milz *C. jejuni*-immunisierter Tiere zeigte sich, dass die Zellen mit den Myelin-Antigenen BPM oder SE nicht kreuzreagierten. Diese fehlende Kreuzreaktivität kam auch darin zum Ausdruck, dass mit BPM und SE als Antigen *in vitro* keine T-Zell-Linien aus *C. jejuni*-immunisierten Ratten generiert werden konnten. Dagegen war es möglich, mit *C. jejuni*-Antigen *C. jejuni*-spezifische T-Zell-Linien erfolgreich zu expandieren und zu etablieren. Bis jetzt wurden in der Literatur noch keine *C. jejuni*-spezifischen Ratten-T-Zellen beschrieben. Es konnte somit der Beweis erbracht werden, dass nach Immunisierung von Lewis-Ratten mit *C. jejuni* *C. jejuni*-spezifische T-Zellen aktiviert und expandiert werden und dass diese auch *in vitro* kultiviert werden können.

Auch wenn *in vitro* aus *C. jejuni*-immunisierten Ratten keine Myelin-spezifischen T-Zellen kultiviert werden konnten, wurden die generierten *C. jejuni*-spezifischen T-Zellen bei weiteren Restimulationen auf ihre Reaktivität mit Myelin-Antigenen untersucht. Es zeigte sich aber auch hierbei keine Kreuzreaktivität mit verschiedenen

Myelin-Antigenen. Dafür wurde die Spezifität für *C. jejuni*-Antigene im Verlauf mehrerer Restimulationen höher, was mit dem antigenspezifischen Zellwachstum zusammenhängt. Bystander-Zellen, die durch *C. jejuni*-Antigene nicht aktiviert werden, werden immer weiter von *C. jejuni*-spezifischen Zellen überwachsen.

Weiterhin wurde versucht, bei Lewis-Ratten durch i.v. Gabe von *C. jejuni*-spezifischen Ratten-T-Zellen eine AT-EAN auszulösen. Zur Induktion einer AT-EAN werden normalerweise P2-spezifische T-Zellen verwendet. Wird mit diesen P2-spezifischen Zellen eine AT-EAN induziert, zeigen sich durchschnittlich nach 4 Tagen erste Anzeichen einer Erkrankung. Bei Verwendung von *C. jejuni* 5646-spezifischen T-Zellen, die in knapp doppelter Menge wie bei P2-spezifischen Zellen üblich, eingesetzt wurden, zeigten sich bei den Versuchstieren 7-20 Tage nach der i.v. Gabe keine Krankheitszeichen. Eine Induktion einer AT-EAN ist also durch i.v. Gabe *C. jejuni*-spezifischer Ratten-T-Zellen nicht möglich.

Dass durch die i.v. Gabe von *C. jejuni*-spezifischen Zellen keine AT-EAN ausgelöst wurde, liegt wahrscheinlich daran, dass die *C. jejuni*-spezifischen Zellen nicht mit Myelin-Antigenen kreuzreagieren. Auf der Basis dieses *in vitro*-Ergebnisses wurde auch nur ein kleiner *in vivo* Versuch durchgeführt.

Sowohl die aktive Immunisierung als auch die Generierung *C. jejuni*-spezifischer T-Zell-Linien erfolgte gegen das immunogenste Antigen des *C. jejuni*-Antigengemisches. Dieser immunogenste Bestandteil erscheint in beiden Untersuchungsverfahren nicht neuritogen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sowohl bei der Immunisierung, als auch bei der *in vitro*-Generierung der spezifischen Zellen schwache, aber neuritogene Bestandteile des *C. jejuni*-Antigengemisches überwachsen werden und in genügend hoher Konzentration neuritogen wären.

Wurden die generierten *C. jejuni*-spezifischen Ratten-T-Zellen durch FACS-Analyse bezüglich ihres Phänotyps untersucht, ergab sich für die beiden untersuchten Zell-Linien ein CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>-Phänotyp mit  $\alpha/\beta$ -T-Zellrezeptor auf der Oberfläche. Da bis jetzt noch keine *C. jejuni*-spezifischen Ratten-T-Zellen in der Literatur beschrieben wurden, ist auch über deren Phänotyp noch nichts bekannt.

### 3.1.3 Generierung von *C. jejuni*-spezifischen humanen T-Zellen

Da die Reaktivitäten von T-Zellen durch MHC-Moleküle bestimmt werden und diese bei Ratten und Menschen entscheidende Konformationsunterschiede aufweisen (Günther und Walter 2000), wurden humane *C. jejuni*-spezifische T-Zellen generiert. Dadurch sollten mögliche zelluläre Kreuzreaktionen zwischen *C. jejuni* und verschiedenen Nervenantigenen im humanen System untersucht werden.

Burns et al. zeigten 1986, dass mit bovinem P2 reaktive T-Zell-Linien sowohl aus den PBLs gesunder Donoren, als auch aus denen eines GBS-Patienten gewonnen werden können. Weiterhin konnten Weishaupt et al. 1995 zeigen, dass mit humanem, rekombinantem P2 ebenfalls T-Zell-Linien aus den PBLs gesunder Donoren generiert werden konnten. Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass ein Potential für autoimmune Reaktionen mit PNS-Myelin-Antigenen in gesunden Personen und bei Patienten neurologischer Erkrankungen bereits vorhanden ist (Burns et al. 1986).

Als *C. jejuni*-Antigen haben wir einen *C. jejuni*-Stamm ausgewählt. Bei diesem handelt es sich um den Stamm HB 93-13, der aus der Stuhlprobe einer Patientin mit GBS der AMAN-Form isoliert wurde (Nachamkin et al. 2001). Zusätzlich zu der in der Einleitung erwähnten Tatsache (siehe 1.1.4.2), dass die AMAN-Form des GBS häufig im Zusammenhang mit einer vorhergehenden *C. jejuni*-Erkrankung steht, handelt es sich bei HB 93-13 um einen *C. jejuni*-Stamm des Typs O:19, der bei GBS signifikant gehäuft gefunden wurde, und der von Li zum Füttern von Hühnern eingesetzt wurde, um ein Tiermodell für das *C. jejuni*-assoziierte GBS zu erhalten (Li et al. 1996). Deswegen erscheinen gegen *C. jejuni* HB 93-13 generierte humane Zellen besonders interessant.

Bei sechs von elf gesunden Donoren und bei einer GBS-Patientin konnten *C. jejuni*-spezifische T-Zell-Linien etabliert werden. Alle Zell-Linien, die der gesunden Donoren und die der GBS-Patientin, reagierten mit allen getesteten *C. jejuni*-Stämmen (5646, 5647, OH 4382, OH 4384 und HB 93-13) als Antigen. Eine Kreuzerkennung bakterieller Antigene von *Salmonella typhimurium* konnte ausgeschlossen werden. Alle gegen HB 93-13 generierten T-Zell-Linien erkennen *C. jejuni*-Protein als Antigen und nicht *C. jejuni*-LPS. Dies konnte durch die Verwendung von LPS, das mit Pronase K verdaut worden war, in Form fehlender Proliferation gezeigt werden.

Eine Kreuzreaktivität mit Myelinantigenen konnte nur bei Zell-Linien des Donors NK nachgewiesen werden. Die drei T-Zell-Linien des Donors NK, NK-3, NK-13 und NK-19 zeigten eine Kreuzreaktivität mit humanem rekombinanten P2-Protein. Mit den anderen getesteten Myelinantigenen (humanes rekombinantes P0, humanes MBP, BPM, BCM, SE, P2, Ratten- und Meerschweinchen-MBP) zeigte sich bei keiner T-Zell-Linie eine Kreuzreaktivität.

Die Zell-Linie NK-3 zeigte auch ein Wachstum mit den bovinen P2-Peptiden 115-131 und 70-90, nicht jedoch mit dem humanen P2-Peptid 70-90 (das humane P2-Peptid 115-131 wurde nicht getestet).

human 70-90:	Phe-Glu-Glu-Thr-Thr-Ala-Asp-Asn-Arg-Lys-Thr-Lys-Ser- <u>Ile</u> -Val-Thr-Leu- <u>Ala</u> -Arg-Gly-Ser
bovin 70-90:	<b>Phe-Glu-Glu-Thr-Thr-Ala-Asp-Asn-Arg-Lys-Thr-Lys-Ser-<u>Thr</u>-Val-Thr-Leu-<u>Gln</u>-Arg-Gly-Ser</b>
bovin 115-131:	<b><u>Val</u>-Glu-Cys-Lys-Met-Lys-<u>Asp</u>-Val-Val-Cys-Thr-Arg-Ile-Tyr-Glu-Lys-Val</b>
human 115-131:	<u>Ala</u> -Glu-Cys-Lys-Met-Lys- <u>Gly</u> -Val-Val-Cys-Thr-Arg-Ile-Tyr-Glu-Lys-Val

*Bild 3.1: Peptidsequenzen der humanen und bovinen P2-Peptide 70-90 und 115-131 aus Suzuki et al. 1982. Unterstrichen sind die jeweils unterschiedlichen Aminosäuren.*

Bei einem Sequenzvergleich der bovinen und humanen P2-Proteine (Bild 3.1) zeigt sich, dass im Peptid-Bereich 70-90 zwei Aminosäuren verschieden sind: an Position 83 findet sich im humanen Protein Isoleucin statt Threonin und an Position 87 im humanen Protein Glutamin statt Alanin im bovinen Protein (Suzuki et al. 1982). Diese Abweichungen an Position 83 und 87 könnten erklären, warum die Zell-Linie NK-3 nur mit dem bovinen P2-Peptid 70-90 und nicht auch mit dem humanen P2-Peptid 70-90 eine Proliferation zeigt. Weiterhin zeigt sich beim Vergleich der Aminosäuresequenzen bovin 70-90 und bovin 115-131 ein komplett anderer Aufbau der beiden Peptide, und innerhalb dieser unterschiedlichen Sequenzen können auch keine kleineren übereinstimmenden Fragmente gefunden werden. Es handelt sich also um völlig verschiedene Peptide, die eventuell ähnliche physikalische Eigenschaften aufweisen. Deswegen nehmen wir an, dass es sich bei der getesteten Zell-Linie NK-3 um

polyreaktive Zellen mit einer degenerierten Antigen-spezifität handelt, da aufgrund der nachgewiesenen Promiskuität von T-Zell-Rezeptoren auch sehr verschiedene Aminosäuresequenzen als Aktivatoren in Frage kommen (Hemmer et al. 1997). Eine alternative Erklärung wären verschiedene T-Zell-Populationen (Klone), von denen einer mit bovinem P2-Peptid 70-90, ein anderer mit bovinem P2-Peptid 115-131 kreuzreagiert.

Um die bei der Antigenpräsentation beteiligten MHC-Antigene zu identifizieren, wurden im Proliferationsassay MHC-Klasse II-spezifische Antikörper eingesetzt. Bei den untersuchten Zell-Linien wurde das Wachstum durch  $\alpha$ DR- und  $\alpha$ DP,DQ,DR-Antikörper, nicht aber durch  $\alpha$ DP- und  $\alpha$ DQ-Antikörper blockiert. Das bedeutet, dass das *C.jejuni*-Antigen in Verbindung mit HLA-DR-Molekülen auf den APCs erkannt wird. Speziell für die Patientin VR kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine zuerst angenommene CD1-Restriktion ausgeschlossen werden, da durch die Antikörper  $\alpha$ DQ,  $\alpha$ DR und  $\alpha$ DP,DQ,DR eine Supprimierung der Präsentation, und durch die APCs von Donor RG keine Präsentation von *C. jejuni*-Antigenen stattfindet.

Der HLA-DR-Haplotyp des Donors NK war mit DR-1/11 bekannt. Deswegen wurde die Zell-Linie NK-3 im Proliferationsassay mit APCs anderer Donoren, die mit dem Donor NK in jeweils einem HLA-DR-Allel übereinstimmten, getestet, um die Restriktion der Zell-Linie zu untersuchen. Hierbei wurde DR-11 als Restriktionselement identifiziert. Es ist festzuhalten, dass sowohl die Erkennung von *C. jejuni*-Antigenen, als auch die Kreuzreaktivität mit dem Myelinantigen P2, DR-11 restringiert sind.

Winer et al. fanden 1988(b) keine Häufung bestimmter HLA-Klasse I- oder Klasse II-Moleküle beim GBS bei 89 Patienten aus dem UK. Ebenso fanden Kaslow et al. 1984 keine Dominanz von bestimmten HLA-Klasse I-Antigenen bei 92 GBS-Fällen in den USA und auch Ma et al. fanden 1998 bei 81 japanischen Patienten keine Kopplung von HLA-Antigenen und GBS. Wenn dagegen nicht alle aufgetretenen GBS-Fälle, sondern nur bestimmte Untergruppen untersucht wurden, konnten eher Häufungen gesehen werden: z.B. das Vorkommen von HLA DQB1\*03 bei 83% von 30 GBS-Patienten mit einem serologischen Nachweis einer vorhergehenden *C. jejuni*-Infektion im Vergleich zu 49% ohne Infektion (Rees et al. 1995c). Eine Häufung von HLA DR3 wurde bei 38 mexikanischen GBS-Patienten gefunden (Gorodezky et al. 1983). In einer Studie mit 42

japanischen *C. jejuni*-assoziierten GBS-Patienten wurde dagegen keine Häufung von HLA DR3 festgestellt (Ma et al. 1998), es ist jedoch auch darauf hinzuweisen, dass Zusammenhänge zwischen bestimmten Krankheiten und HLA-Genen bei verschiedenen Rassen differieren können (Hughes et al. 1999). Es wurde außerdem von einem gehäuften Auftreten von HLA-B35-Antigenen bei japanischen *C. jejuni*-assoziierten GBS-Patienten berichtet (Sugita et al. 1994, Yuki et al. 1991, 1992). Bei chinesischen GBS-Patienten wurde eine schwache Häufung von HLA DRB1\*1301 bei 12 AIDP, jedoch nicht bei 31 AMAN-Fällen gefunden (Monos et al. 1997).

Da bei GBS-Patienten damit insgesamt keine Häufung bestimmter HLA DR-Allele nachgewiesen wurde, jedoch in verschiedenen Studien von GBS-Patienten mit einer serologisch nachgewiesenen vorhergehenden *C. jejuni*-Infektion jeweils eine Häufungen bestimmter HLA DR-Allele gefunden wurde, ist es möglich, dass speziell eine GBS-Erkrankung nach einer *C. jejuni*-Infektion an das Vorhandensein bestimmter HLA DR-Allele geknüpft ist. Da in den oben genannten Studien jedoch unterschiedliche HLA DR-Allele gefunden wurden, sei nochmals auf abstammungsbedingte Einflüsse, die differierende Resultate bedingen, verwiesen (Hughes et al. 1999).

Im Hinblick auf einen Zusammenhang von GBS und dem Auftreten von Antikörpern gegen Gangliosid GM1, wurde eine Verbindung zwischen der Anwesenheit von anti-GM1-Antikörpern im Serum von GBS-Patienten und MHC-Genen gesucht, jedoch nicht gefunden (Rees et al. 1995c; Koga et al. 1998b).

Für die Zell-Linien NK-3, NK-17, NK-19, GF-2, TL-2 und VR-C6 wurde der Phänotyp der Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Alle getesteten Zellen tragen  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptoren, sind vom Phänotyp  $CD4^+/CD8^-$  und erkennen Protein von *C. jejuni*. Dies zeigt, dass Proteine im Vergleich zu Glykolipiden stark immunodominant sind und die T-Zell-Antwort gegen *C. jejuni* prägen. Allein gegen Glykolipide reagierende T-Zell-Populationen wuchsen nicht aus, wurden von uns jedoch deswegen gesucht, weil bereits humane T-Zellen isoliert und identifiziert wurden, die einen  $\alpha/\beta$ -TCR tragen und Komponenten von *Mycobacterium tuberculosis* erkennen, bei denen es sich nicht um Peptide handelt (Sieling et al. 1995; Beckman et al. 1994). Diese T-Zellen erscheinen für Lipide und Glykolipide, die in der Bakterienzellwand vorhanden sind, spezifisch



und erkennen vornehmlich den Kohlenhydratanteil der Glykolipide. Die Erkennung dieser Liganden durch T-Zellen ist durch CD1b-Moleküle auf APCs restringiert und wahrscheinlich erkennen die T-Zell-Rezeptoren einen Komplex, der aus diesem MHC-Klasse I-ähnlichen Protein CD1b und dem Glykolipidliganden gebildet wird. So kommen auch in MS-Patienten mehr dieser Glykolipid-reaktiven T-Zellen vor als bei nicht-MS-Patienten (Shamshiev et al. 1999). Dies legt nahe, dass nicht nur die Autoreaktivität gegen Proteine, sondern auch gegen eigene Glykolipide, die vom Myelin abgeleitet sind, eine immunologische Bedeutung bei der MS und möglicherweise dem GBS haben könnte. Es wurde gezeigt, dass zirkulierende T-Zellen, die für verschiedene Typen von endogenen Glykolipiden spezifisch sind, existieren und die gleichen funktionellen Eigenschaften wie T-Zellen, die für Peptid-MHC-Komplexe spezifisch sind, besitzen (Shamshiev et al. 1999).

Analog stellten Rosat et al. 1999 fest, dass die Antigene, die von CD1-restringierten CD8<sup>+</sup>- $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-T-Zell-Linien erkannt werden, gegenüber breit-reaktiven Proteasen resistent sind und mit organischen Extraktionsprotokollen, die vorzugsweise Lipide isolieren, isoliert werden können. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass CD1a, -b und -c Moleküle darauf spezialisiert sind, Lipid- und Glykolipid-Antigene zu präsentieren, die sich in ihrem chemischen Aufbau von Peptiden, die von MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Moleküle gebunden werden, unterscheiden (Rosat et al. 1999).

Eine weitere Rolle in der Pathogenese von GBS spielen möglicherweise neben  $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-Zellen auch  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-Zellen (Ben-Smith et al. 1996, 1997; Cooper et al. 2002).  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-Zellen konnten aus Biopsien peripherer Nerven von GBS-Patienten mit einer demyelinisierenden Form kultiviert werden und konnten über Immunfärbungen in Nerveninfiltraten nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass eine Reaktivität mit Antigenen der peripheren Nerven, zum Beispiel Gangliosiden, bestehen könnte (Ben-Smith et al. 1996; Winer et al. 2002). Entscheidenderweise wurde bisher nicht gezeigt, dass die besagten  $\gamma\delta$ -T-Zell-Populationen gegen Ganglioside oder *C. jejuni*-Antigene reagieren (Ben-Smith et al. 1996). Wurden aber die  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-Zellen aus dem peripheren Blut von GBS-Patienten mit vorhergehender *C. jejuni*-Infektion mit *C. jejuni* als Antigen konfrontiert, konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der Proliferation der Zellkultur und dem Prozentsatz der  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-Zellen in der stimulierten

Zellkultur nachgewiesen werden (Ben-Smith et al. 1997). Es wird angenommen, dass CD1-Moleküle bei Wechselwirkungen der  $\gamma\delta^+$ -Zellen mit ihren Liganden von essentieller Bedeutung sind. Diesbezüglich wurden die CD1-Moleküle selbst im Biopsiematerial von GBS-Patienten in erhöhtem Maße nachgewiesen (Khalili-Shirazi et al. 1998).

In allen unseren untersuchten *C. jejuni*-spezifischen humanen T-Zell-Linien konnten keine  $\gamma\delta^+$ -Zellen nachgewiesen werden.

## 3.2 Humorale Mechanismen

Bei vielen GBS-Patienten können Serum-Antikörper gegen Bestandteile des peripheren Nervenmyelins nachgewiesen werden (Hughes et al. 1999). Der Suche nach Antikörpern, mit deren Hilfe die verschiedenen klinischen Formen des GBS erklärt werden können, liegt die Hypothese zugrunde, dass eben diese verschiedenen Formen des GBS durch das Vorhandensein von Antikörpern gegen verschiedene Ganglioside determiniert werden könnten, wobei die Ganglioside genau in den Regionen des Nervs vorkommen, die in das klinische Bild der GBS-Form eingebunden sind (Hughes et al. 1999).

Obwohl eine Behandlung des GBS mit Plasmaaustausch vorhandene Antikörper entfernt und eine effektive Therapie darstellt (Guillain-Barré Syndrome Study Group 1985), ist jedoch weiterhin unklar, ob die Antikörper primär für den am Nerv verursachten Schaden verantwortlich sind, oder ob sie lediglich ein Epiphoromen darstellen (Hadden et al. 2001a).

Ein Zusammenhang zwischen dem Antikörperlevel und dem Krankheitsgrad ist nicht festzustellen, da zum einen keine Antikörper spezifisch beim GBS nachgewiesen werden konnten, und zum anderen alle detektierten Antikörper auch bei den Kontrollpatienten gefunden wurden (Hughes et al. 1999).

### 3.2.1 Immunisierung mit *C. jejuni*-Antigenen und Induktion einer AT-EAN

Bei einer AT-EAN wird die Blut-Nerv-Schranke durch die Injektion von aktivierten T-Zellen gegen P2-Protein durchlässig (Hadden et al. 1999). Dadurch können zuvor gebildete Antikörper ins Nervensystem übergehen, was die Synergie zwischen T-Zellen

---

und Antikörpern darstellt. Anti-Myelin-Antikörper können so die myelintoxische Wirkung der reinen Entzündung potenzieren (Hadden et al. 2001a).

Für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung von *C. jejuni*-spezifischen Antikörpern wurden Lewis-Ratten mit verschiedenen *C. jejuni*-Antigenen immunisiert und geboostert und nach 21 Tagen wurde durch Spritzen von P2-spezifischen Zellen, eine AT-EAN zur Öffnung der Blut-Nerv-Schranke ausgelöst.

Bei Verwendung von Gesamt-*C. jejuni* 5646 und 5647, sowie nach Immunisierung mit Lipopolysacchariden von *C. jejuni* 5646, 5647 oder HB 93-13, zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe insgesamt kein signifikant schwererer Krankheitsverlauf.

Im klinischen Verlauf zeigte sich durch Induktion von Antikörpern gegen *C. jejuni*-Antigene also keine Verstärkung im Vergleich zur AT-EAN in den Kontrollgruppen. Jedoch konnte durch serologische Untersuchungen eine starke humorale Reaktion auf die Immunisierung mit *C. jejuni*-Antigenen durch den Nachweis hoher *C. jejuni*-Antikörper-Titer festgestellt werden.

In Übereinstimmung mit unseren Resultaten wurde in einer allerdings sehr kleinen Studie mit Serum nur eines GBS-Patienten ein negatives Ergebnis erzielt, das heißt, nach Öffnen der Blut-Nerv-Schranke durch eine geringe Zahl P2-reaktiver Zellen wurde das Serum eines GBS-Patienten mit hohem *C. jejuni*-Antikörpertiter intraperitoneal gespritzt und wurden keine Anzeichen einer Paralyse oder histologische Zeichen einer EAN beobachtet (Rostami 1997). Hadden et al. verwendeten 2001a Seren von elf GBS-Patienten und Kontrollseren und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den klinischen, neurophysiologischen oder histopathologischen Veränderungen zwischen den Ratten, die Serum von GBS-Patienten, und den Ratten, die Kontrollserum erhalten hatten; lediglich verursachte das GBS-Serum einen insignifikant geringeren Gewichtsverlust. Zusammenfassend können diese negativen Ergebnisse im tierexperimentellen *in vivo*-System die angenommene funktionelle Bedeutung von Antikörpern in der Pathogenese des GBS nicht untermauern.

Neben Serum von GBS-Patienten wurde von Hadden et al. 2001a auch der monoklonale Maus-Antikörper cGM3, der gegen *C. jejuni*-LPS OH 4384 generiert wurde und mit den Gangliosiden GT1a, GQ1b und GD3 kreuzreagiert (Goddeyear et al. 1999), nach Öffnen der Blut-Nerv-Schranke in Ratten i.p. injiziert. Es zeigten sich jedoch keine

klinischen, neurophysiologischen oder histologischen Effekte im Sinne einer Aggravation der EAN auf diesen *in vivo*-Transfer wie sie zuvor von Goodyear et al. 1999 *in vitro* gezeigt wurden. Das Fehlen von Ablagerungen von monoklonalem Maus-Antikörper an Ratten-neuromuskulären Verbindungen (Hadden et al. 2001a), im Gegensatz zu den starken Ablagerungen in der Maus (Goodyear et al. 1999), läßt annehmen, dass der Antikörper gegen ein Antigen oder Antigene gerichtet ist, das oder die in der Ratte nicht vergleichbar präsent sind wie in der Maus. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sich die Konzentration des Antikörpers *in vivo* schnell verringert bzw. abnimmt und so nicht mehr detektierbar ist. Nichtsdestotrotz spricht die Anwesenheit von IgM im Kapillarbett von einer zumindest vorübergehend erreichten detektierbaren zirkulierenden Konzentration. Einschränkend ist darauf hinzuweisen, dass der eingesetzte monoklonale Antikörper cGM3 ein IgM-Antikörper ist. Die bei GBS-Patienten nachgewiesenen Antikörper gegen das Gangliosid GM1 sind meistens vom Typ IgG. Antikörper gegen GM1 vom Isotyp IgM wurden in wesentlich geringerem Maße nachgewiesen (Jacobs et al. 1996; Koga et al. 2001). Außerdem sind die aktiven Faktoren für die Störung in der neuromuskulären Übertragung alleine in der IgG-Fraktion ansässig, da nur durch GBS-Serum und aufgereinigtes IgG, nicht jedoch durch aufgereinigtes IgM ein Effekt auf die neuromuskuläre Übertragung gezeigt werden konnte (Buchwald et al. 1995, 1998b, 2001). Daher ist der Einsatz von cGM3 in den dargestellten Experimenten im Hinblick auf die Immunpathogenese des GBS nur von bedingter Relevanz.

In unseren Versuchen wurden die Antikörper nicht in Form von GBS-Serum oder monoklonal gespritzt, sondern vor Öffnen der Blut-Nerv-Schranke polyklonal selbst vom Organismus produziert. Durch einen serologischen ELISA-Test konnte nachgewiesen werden, dass die Antikörper gegen *C. jejuni* in ausreichendem Maße gebildet wurden, um einen Einfluß auf das Krankheitsbild der AT-EAN zu haben. Da jedoch kein Einfluß auf eine später induzierte AT-EAN festgestellt werden konnte, sind unsere Ergebnisse kompatibel mit den von Hadden mit GBS-IgG und dem monoklonalen Antikörper cGM3 erhobenen.

### 3.2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen von *C. jejuni*-Immuseren

Der Einfluß von Antikörpern, die durch die Immunisierung mit *C. jejuni*-Antigenen im Serum vorhanden waren, wurde anhand der Messung der präsynaptischen Quantenfreisetzung bei der neuromuskulären Übertragung am Mäusezwerchfell untersucht. Bei diesen elektrophysiologischen Messungen zeigten sich für verschiedene *C. jejuni*-Stämme, die zur Immunisierung eingesetzt wurden, verschiedene Ergebnisse: bei Applikation von Serum mit *C. jejuni* HB 93-13 immunisierter Tiere zeigte sich keine Reduktion der präsynaptischen Quantenfreisetzung. Im Gegensatz dazu führte die Applikation von Serum mit *C. jejuni* PG 836 immunisierter Ratten zu einer starken Supprimierung der präsynaptischen Quantenfreisetzung, die auch nach einem Washout nicht reversibel war.

IgGs von Patienten mit MFS oder GBS können die neuromuskuläre Übertragung stören, indem sie in elektrophysiologischen Untersuchungen am Mäusezwerchfell eine Reduktion der präsynaptischen Quantenfreisetzung induzieren (Buchwald et al. 1998c). So induziert zum Beispiel Serum von MFS-Patienten, in dem anti-GQ1b-Antikörper enthalten sind, komplement-abhängige elektrophysiologische Abweichungen (Paparounas et al. 1999; Plomp et al. 1999). Auch eine Immunisierung von Mäusen mit LPS, das Strukturähnlichkeiten zum Gangliosid GT1a aufweist, produziert ein Serum, in dem anti-GQ1b-Antikörper enthalten sind. Diese Antikörper induzieren die Freisetzung von Acetylcholin, gefolgt von einem komplement-abhängigen Leitungsblock (Goodyear et al. 1999).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Effekte auch mit GQ1b- und GM1-negativem Serum erzielt werden können (Buchwald et al. 1998a,b,c). Aus diesem Grund ist die Rolle von anti-Gangliosid-Antikörpern nicht sicher geklärt und es wird erneut deutlich, dass eine Nervenschädigung im GBS und MFS nicht ausschließlich durch einen Faktor ausgelöst wird (Moran et al. 2002).

Dass die Quantenfreisetzung an der neuromuskulären Endplatte des Mäusezwerchfells nach der Applikation von Serum *C. jejuni* PG 836-immunisierter Tiere, nicht jedoch nach der Applikation von Serum *C. jejuni* HB 93-13-immunisierter Tiere, reduziert wurde, kann damit zusammenhängen, dass es sich bei dem *C. jejuni*-Stamm HB 93-13 um den Serotyp O:19, bei dem *C. jejuni*-Stamm PG 836 um den Serotyp O:10 handelt. Dadurch können unterschiedlich reaktive Antikörper gebildet werden, die sich sicher

auch in ihrer Menge und ihren Isotypen unterscheiden und die unterschiedliche Effekte auf die Übertragung an der neuromuskulären Endplatte ausüben. Weiterhin handelt es sich bei dem Stamm *C. jejuni* PG 836 um einen aus einem MFS-Patienten isolierten Stamm (Salloway et al. 1996), bei *C. jejuni* HB 93-13 um einen aus einem GBS-Patienten isolierten Stamm (Nachamkin et al. 2001). Diesbezüglich ist festzuhalten, dass auch bei früheren elektrophysiologischen Untersuchungen Unterschiede in den Effekten der IgG-Fractionen von Patienten mit GBS und MFS hinsichtlich dem Zeitverlauf, der Reversibilität und der Polarisationsabhängigkeit der Blockade zu sehen waren (Buchwald et al. 1998c). So setzt die Reduzierung der Quantenfreisetzung nach Applikation von Serum von MFS-Patienten schneller ein als nach Applikation von GBS-Serum und diese Reduzierung ist auch nach einem Washout bei Serum von MFS-Patienten schneller wieder reversibel als bei Serum von GBS-Patienten (Buchwald et al. 1995, 1998c). Diese Beobachtungen könnten erklären, dass auch Rattenserum nach Immunisierung mit dem MFS-Stamm PG 836 einen größeren Einfluß auf die neuromuskuläre Übertragung ausübt als Rattenserum nach Immunisierung mit dem GBS-Stamm HB 93-13. Zusammen sprächen die Ergebnisse sehr wohl für funktionelle Effekte der entsprechenden Antikörper.

### **3.2.3 Generierung monoklonaler Antikörper gegen *C. jejuni***

Wurde nicht wie eben erwähnt GBS-Serum, sondern der gegen *C. jejuni*-LPS generierte und mit den Gangliosiden GT1a, GQ1b und GD3 kreuzreaktive IgM-Antikörper cGM3 (Goodyear et al. 1999) für elektrophysiologische Messungen eingesetzt, findet eine Reduzierung der präsynaptischen Quantenfreisetzung statt, die nach einem Washout reversibel ist (Buchwald et al. 2002). Da jedoch IgM ein viel größeres Molekül als IgG ist, daher stärker im intravasalen Raum verbleibt, die Blut-Nerv-Schranke wahrscheinlich weniger effizient durchquert als IgG (Hadden et al. 2001a) und der IgM-Antikörper cGM3 bei Versuchen in der Ratte zu keinem „positiven Ergebnis“ geführt hat (Hadden et al. 2001a), haben wir versucht, einen IgG-Antikörper gegen *C. jejuni*-LPS zu generieren.

Nach Immunisierung von Balb/c Mäusen mit *C. jejuni*-LPS und nachfolgender Fusion der Milzzellen mit Ag8 Zellen wurden Hybridome erhalten, die *C. jejuni*-spezifische Antikörper produzieren. Neben vielen Hybridomen, die IgM-Antikörper gegen Gesamt-

---

*C. jejuni* oder *C. jejuni*-LPS produzieren, erhielten wir auch die gewünschten Hybridome, die IgG-Antikörper gegen Gesamt-*C. jejuni* und vor allem gegen *C. jejuni*-LPS herstellen. So produziert zum Beispiel das Hybridom N-14 IgG-Antikörper gegen *C. jejuni*-LPS OH 4384.

Neben ihrer Reaktivität im ELISA wurde die Reaktivität der gebildeten Antikörper auch im Western Blot getestet. Dabei zeigte sich, dass die meisten Hybridomüberstände nur eine Bande erkennen. Der Überstand des Hybridoms N-14 zeigte dagegen eine Reaktion mit mehreren Banden. Außerdem konnte mit demselben Überstand gezeigt werden, dass verschiedene *C. jejuni*-Stämme erkannt werden, jedoch keine Antigene von *Salmonella typhimurium*. Ein Hinweis auf eine mögliche Pathogenität des Antikörpers wird dadurch gegeben, dass Hadden et al. 2001a im Western Blot zeigten, dass es kein Antikörper gegen ein einzelnes *C. jejuni*-Protein ist, der an der GBS-Pathogenese beteiligt ist.

Um die *C. jejuni*-spezifischen Antikörper auf eine mögliche Reaktivität mit Gangliosiden zu untersuchen, wurden Dot Blots durchgeführt. Allerdings konnte für den Antikörper N-14 nur die Reaktivität mit *C. jejuni*-Antigenen bestätigt werden. Der Nachweis einer Reaktion mit den eingesetzten Gangliosiden GM1, GQ1b, GD1a, GT1b und GD1b konnte nicht erbracht werden.

Im Gegensatz dazu zeigten Goodyear et al. 1999, dass bei Mäusen nach einer oder mehreren Immunisierungen mit aufgereinigtem LPS von *C. jejuni*-Stämmen in einigen Mäusen LPS/Gangliosid-spezifische Antikörperantworten detektiert werden konnten. Nach der LPS-Immunisierung wurden die Mäuse oft unspezifisch krank; es zeigten sich aber wie auch in unseren Versuchen keine klinischen Zeichen einer Neuropathie. Es wurden Klone, die IgM und IgG Antikörper gegen LPS der *C. jejuni*-Stämme OH 4382 und OH 4384 bilden, generiert. Die IgM-Antikörper, erkennen neben den Lipopolysaccharide der *C. jejuni*-Stämme OH 4382, OH 4384 und PG 836 auch die Ganglioside GT1a, GQ1b und GD3, keiner der IgG-Antikörper erkennt die Ganglioside GM1 und GD1a (tabellarische Übersicht in Goodyear et al. 1999). Im Gegensatz dazu gelang es mit einem nicht sialysierten *C. jejuni*-LPS eines Stammes O:3, das somit keine einem Gangliosid ähnliche Struktur aufweist (Moran und Prendergast 2001), zwar eine starke Reaktion gegen die O-Seitenketten des *C. jejuni* O:3-LPS, jedoch nicht

gegen Ganglioside nachzuweisen (Goodyear et al. 1999). *C. jejuni*-Stämme des Serotyps O:3 wurden auch von GBS-Patienten noch nicht isoliert (Moran et al. 1996).

Auch eine aktive Immunisierung von Hasen mit *C. jejuni*-LPS, das eine GM1-ähnliche Struktur hat, führte zur Produktion einer großen Menge an Antikörpern, die mit dem Gangliosid GM1 kreuzreagieren (Ang et al. 2000). Eine Immunisierung von Hasen mit *C. jejuni*-LPS, das eine dem Gangliosid GM2 ähnliche Struktur hat, führt zur Bildung von GM2-kreuzreaktiven Antikörpern (Ritter et al. 1996). Wurde hier allerdings direkt mit dem Gangliosid GM2 immunisiert, konnten im ELISA nur wenige IgG und IgM-Antikörper nachgewiesen werden.

Der Nachweis einer Kreuzreaktivität unseres generierten mAk aus dem Hybridom N-14 gegen *C. jejuni*-LPS HB 93-13 mit einem oder mehreren Gangliosiden wäre aufgrund der nachgewiesenen Strukturähnlichkeit zwischen verschiedenen Gangliosiden und dem LPS von *C. jejuni*-Stämmen (Übersicht in Moran und Prendergast 2001) von entscheidender Bedeutung. Außerdem, weil in Patienten mit GBS anti-Gangliosid-Antikörper im Serum in Konzentrationen von bis zu 78% anti-GM1-Antikörper (Von Wulffen et al. 1994) oder 62% anti-GT1a-Antikörper (Koga et al. 1999) nachgewiesen wurden. Am häufigsten belegt ist der Nachweis von anti-GM1-Antikörpern, auch wenn ihre Verbreitung zwischen 0 und 82% schwankt (Moran und Prendergast 2001). Es wird auch angenommen, dass die Anwesenheit von anti-GM1-Antikörpern bei GBS-Patienten als Hinweis für einen axonalen Schädigungstypus und eine schlechtere Erholung gesehen werden kann (Ilyas et al. 1992; Walsh et al. 1991). Dieser Meinung wird jedoch in anderen Publikationen widersprochen (Enders et al. 1993; Vriesendorp et al. 1993). Wie bereits zuvor erwähnt, ist es ein Ziel der Forschung, einen Zusammenhang zwischen den vorkommenden anti-Gangliosid-Antikörpern und verschiedenen klinischen Krankheitsbildern des GBS zu finden (Hughes et al. 1999). Die Tatsache, dass unser gegen *C. jejuni*-LPS HB 93-13 generierter mAk aus dem Hybridom N-14 gegen verschiedene *C. jejuni*-Antigene, aber im Dot Blot nicht gegen Ganglioside reagiert, kann, wie bereits erwähnt, auch an den zur Immunisierung eingesetzten Mäusen liegen.

Dieser gegen *C. jejuni*-LPS HB 93-13 generierte mAk vom Isotyp IgG aus dem Hybridom N-14 wurde auch zu elektrophysiologischen Untersuchungen an der



neuromuskulären Endplatte des Mäusezwerchfells eingesetzt. Dabei zeigte er nach Applikation eine Reduzierung der präsynaptischen Quantenfreisetzung, die nach einem Washout partiell reversibel war. Dieser reversible Effekt ist nicht so extrem ausgeprägt wie bei der Untersuchung des IgM Antikörpers cGM3 (Buchwald et al. 2002), jedoch auch deutlich meßbar. Bei diesem Unterschied könnte es sich auch nur um eine Konzentrationsfrage handeln, da für die Messung des IgG-Antikörpers die vierfache Konzentration eingesetzt wurde wie für die Messung des Antikörpers cGM3.

Auch wenn unser generierter mAk nicht mit Gangliosiden kreuzreagiert (siehe oben), zeigt er einen Effekt an der Neuromuskulären Endplatte, was deutlich macht, dass eine Störung der Übertragung an der neuromuskulären Endplatte nicht (nur) durch anti-Gangliosid-Antikörper verursacht wird (Buchwald et al. 1998a,b,c).

### 3.3 Immuntoleranz

Die orale Verabreichung eines Proteins führt zu einer spezifischen immunologischen Hyporeaktivität, der oralen Toleranz (Garside und Mowat 1997). Prozesse, die zu Autoimmunerkrankungen führen, sollen durch die orale Toleranz reguliert oder gehemmt werden, was sich durch die Stimulation der natürlichen mukosalen Immunmechanismen im Dünndarm ergibt.

Orale Toleranz wurde durch fünfmaliges Füttern mit bovinem Myelin induziert. Um den Einfluss von *C. jejuni*-LPS auf die orale Toleranz zu untersuchen, wurde bei einem Teil der Lewis-Ratten zusätzlich zum BPM noch *C. jejuni*-LPS HB 93-13 gefüttert. Einen Tag nach der letzten Applikation wurde durch subkutane Immunisierung mit BPM in CFA eine aktive EAN ausgelöst. Die Tiere, die mit BPM alleine gefüttert worden waren, zeigten nur eine Schwanzlähmung und keine weitere Beeinträchtigung in der Fortbewegung; sie konnten vor deutlichen Krankheitszeichen einer EAN bewahrt werden. Tiere, die mit BPM und *C. jejuni*-LPS HB 93-13 gefüttert worden waren, erkrankten früher, aber in gleicher Schwere wie Kontrolltiere, die nur mit *C. jejuni*-LPS HB 93-13 oder Puffer gefüttert worden waren.

Es wurde gezeigt, dass die orale Applikation von *C. jejuni*-LPS und somit seine Anwesenheit im oberen Gastrointestinaltrakt, wo es während einer *C. jejuni*-vermittelten Enteritis gebildet wird, den Mechanismus der physiologischen Immunregulation von PNS-reaktiven Zellen stören kann. Insofern verhindert das LPS

die Induktion einer myelin-spezifischen oralen Toleranz und die Induktion der Resistenz gegenüber einer myelin-induzierten autoimmunen Neuritis. Im Gegensatz dazu verursacht das LPS einen beschleunigten Ausbruch der EAN. Die Ergebnisse sind relevant für das Verständnis der Pathogenese von *C. jejuni*-verbundenem GBS, da bis jetzt noch nicht gezeigt wurde, warum beim GBS die enterale Konfrontation des Immunsystems mit antigenen Strukturen, die die Antigene des PNS nachahmen, in einer Autoimmunität und nicht in einer Toleranz resultieren kann.

Die Verhinderung der Toleranzinduktion durch *C. jejuni*-LPS ist nicht spezifisch für *C. jejuni*. Es wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass auch das LPS von *E. coli* die orale Toleranz durch Myelin und die Resistenz gegen Krankheitszeichen einer EAN verhindern kann und statt dessen eine beschleunigte EAN verursacht (Gaupp et al. 1997a). Dennoch reflektiert dies die Modulation dieses antigen-spezifischen immunregulatorischen Phänomens gegenüber Myelin durch LPS, und nicht einfach eine zelluläre Aktivierung durch LPS, da das Füttern von LPS alleine das Auftreten der EAN nicht beschleunigt.

Ratten, die mit *C. jejuni*-LPS alleine gefüttert wurden, hatten höhere Titer BPM-spezifischer Antikörper als Ratten, die alleine mit Puffer gefüttert wurden. Man kann nicht definitiv sagen, ob dies auf einer LPS-induzierten unspezifischen B-Zell-Aktivierung oder auf einer Kreuzreaktivität *C. jejuni*-LPS-spezifischer-Antikörper mit BPM beruht. Die EAN wurde in diesen Ratten nicht verschlimmert, womit die Ergebnisse auf der gleichen Linie liegen wie die von Hadden, der keine Verschlimmerung einer T-Zell-vermittelten EAN nach einer Injektion von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für *C. jejuni*-LPS sind, feststellen konnte (Hadden et al. 2001a).

Letztlich war auch zu fragen, ob durch die *orale* Gabe von Gesamt-*C. jejuni* eine EAN induziert werden kann, und ob durch die orale Gabe von *C. jejuni*-Antigenen eine Aggravation einer anschließend aktiv induzierten EAN im Vergleich zu Kontrolltieren hervorgerufen werden könnte. Der gleiche Versuch führte bei zwei Versuchsansätzen zu völlig entgegengesetzten Ergebnissen: im ersten Versuchsansatz wurden mit Gesamt-*C. jejuni* gefütterte Tiere wesentlich stärker krank als die mit Puffer gefütterten Kontrolltiere. Im zweiten Versuchsansatz dagegen hat eine Fütterung mit Gesamt-

---

*C. jejuni* schlimmere Krankheitszeichen einer EAN verhindert und die Puffergefütterten Kontrolltiere erkrankten wesentlich stärker. Das Ergebnis des ersten Versuchsansatzes wurde durch histologische Untersuchungen bestätigt. Bei den mit *C. jejuni* HB 93-13 gefütterten Tieren konnte eine deutliche Ausprägung der Demyelinisierung und Degeneration von Axonen und entzündliche Infiltrate über den gesamten Nerv nachgewiesen werden. Die Infiltrate wurden mittels Immunhistochemie untersucht und es wurde gezeigt, dass ein großer Teil der CD4<sup>+</sup>-Zellen T-Helferzellen sind und, im Gegensatz zu den PBS-gefütterten Kontrolltieren, mehr aktivierte Makrophagen vorhanden sind.

Auch durch die enterale Gabe von *Salmonella typhimurium* konnten deutliche Immuneffekte induziert werden. Einerseits wurde die EAN verstärkt, in anderen Experimenten verlief sie in deutlich abgeschwächter Form. Diese Effekte sind aufgrund ihrer Stärke und ihrer Ausprägung sicher nicht natürlichen Ursprungs. Die diskrepanten Endergebnisse sprechen dafür, dass hier ein hochkomplexes, immunregulatorisches System untersucht worden ist, in dem viele unbekannte einzelne Faktoren, die in den verschiedenen Experimenten nicht immer gleich gehalten werden können, eine Rolle spielen. Einzelne dieser Faktoren scheinen dafür ausschlaggebend zu sein, ob durch *Salmonella typhimurium* eine Immunabschwächung oder –aktivierung erfolgt.

Insgesamt können die diskrepanten Ergebnisse eine Neuritogenität von enteralen *C. jejuni*-Antigenen in der Ratte (wie die Experimente mit subkutaner Immunisierung) verneinen. Da in diesen Experimenten mit sterilen Antigenpräparationen von *C. jejuni* gearbeitet werden musste, stellen die Experimente nicht die „natürliche“ Situation der *C. jejuni*-induzierten Enteritis des Menschen dar. Möglicherweise sind Ereignisse wie bei einer Enteritis (erhöhte Darmmukosapermeabilität, Bakteriämie durch *C. jejuni*) erforderlich, um die gesuchte PNS-spezifische Autoimmunreaktion in Gang zu bringen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien und Geräte

#### 4.1.1 Chemikalien

2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure) (ABTS)	Fa. Sigma
Aceton	Fa. Merck, Darmstadt
Acrylamid 30 % w/v in H <sub>2</sub> O	Fa. Serva, Heidelberg
Aminosäuren, nicht essentielle/Natriumpyruvat	Fa. Gibco, Eggenstein
Ammoniumchlorid	Fa. Sigma
Ammoniumhydroxid	Fa. Sigma
Ammoniumpersulfat (APS) 20 % w/v in H <sub>2</sub> O	Fa. Gibco, Eggenstein
Ammoniumsulfat	Fa. Sigma
Bromphenolblau	Fa. Sigma
BSA (bovines Serumalbumin)	Fa. Roth
Casein	Fa. Sigma
Chloroform	Fa. Baker, Deventer, Holland
Citronensäure	Fa. Boehringer, Heidelberg
Comassie Brilliant Blue R250	Fa. Sigma
Dimethylsulfoxid	Fa. Roth
EDTA	Fa. Sigma
EH (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium)	Fa. Gibco, Eggenstein
Essigsäure	Fa. Roth
Ethanol	Fa. Merck, Darmstadt
Freund'sches Adjuvans (FA)	Fa. Gibco, Eggenstein
Glutaraldehyd	Fa. Merck, Darmstadt
Glycerin	Fa. Merck, Darmstadt
Glycin	Fa. Sigma
Heparin	Fa. Roche
IL-2, human	Fa. Sigma
L-Glutamin	Fa. Gibco, Eggenstein
Lymphoprep	Fa. Pharmacia, Freiburg
Mercaptoethanol	Fa. Roth
Methanol	Fa. Baker, Deventer, Holland
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	Fa. Difco; Augsburg
Natriumacetat	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumazid	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Fa. Merck, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Fa. Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Fa. Merck, Darmstadt
Phenol	Fa. Sigma

Phosphorwolframsäure	Fa. Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol (PEG) 1500	Fa. Sigma
Poly-L-Lysine	Fa. Sigma
Ringerlösung	Fa. Fresenius; Bad Homburg
RPMI 1640 Medium	Fa. Gibco, Eggenstein
Saccharose	Fa. Merck, Darmstadt
Salzsäure rauchend, 37%	Fa. Merck, Darmstadt
Sarkosyl	Fa. Sigma
Sephadex 100-Säule	Fa. Bio-Rad; München
Serum, human von AB-Spendern	Fa. PAA Laboratories; Linz
Serum, Kalb (FCS)	Fa. PAA Laboratories; Linz
Sodium-dodecyl-sulfat (SDS)	Fa. Sigma
Streptavidin/Penicillin	Fa. Gibco, Eggenstein
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin)	Fa. Serva, Heidelberg
[ <sup>3</sup> H]-Thymidin	Fa. ICN
Toluidinblau	Fa. ICN; Eschwege
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Fa. Roth
Tris-HCl	Fa. Sigma
Tween 20	Fa. Merck, Darmstadt
Uranylacetat	Fa. Merck, Darmstadt
VitroClud	Fa. Langenbrinck, Emmendingen
Wasserstoffperoxid 30% „Perhydrol“	Fa. Merck, Darmstadt
Xylol	Fa. Merck, Darmstadt

#### 4.1.2 Medien für die Zellkultur

Waschmedium:	EH-Medium
komplettes RPMI:	RPMI 1640
	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren
	1 mM Natriumpyruvat
Restimulationsmedium für Rattenzellen:	komplettes RPMI
	2 mM L-Glutamin
	0,05 mM Mercaptoethanol
	3 % hitzeinaktiviertes FCS
IL-2-Medium für Rattenzellen:	komplettes RPMI
	10% FCS
	2 mM Glutamin
	8-12% ConAÜ (je nach Charge)
humanes Restimulationsmedium:	komplettes RPMI
	2 mM Glutamin
	5% humanes AB-Serum

humanes IL-2-Medium:	komplettes RPMI 10% humanes AB-Serum 40 U/ml humanes IL-2
Einfriermedium:	12,5 ml komplettes RPMI 10 ml FCS 2,5 ml Dimethylsulfoxid

### 4.1.3 Geräte

Betaplate 96-well harvester	Fa. Pharmacia, Freiburg
Betaplate liquid scintillation counter	Fa. Pharmacia, Freiburg
Biotrap-Elutionskammer	Fa. Schleicher und Schuell
Brutschrank B 6220	Fa. Heraeus
Centrikon T-42K; Rotor A18C	Fa. Kontron
Elektrophoresekammer Mini Protean II Cell	Fa. BioRad
ELISA-reader Multiskan Plus MK II	Fa. Titertek
ELISA-washer Nunc-Immuno Wash 12	Fa. Nunc
FACScan	Fa. Becton Dickinson
Fraktionskollektor Gradi Frac	Fa. Pharmacia Biotech
Gewebeblocksystems TBS 88	Fa. Mechte Medizintechnik
Glasfaser-Filter	Fa. Berthold; Bad Wildbad
Heißluftschrank Varioklav Typ 500	Fa. H+P Labortechnik
IKA-Ultraturrax-T28	Fa. Janke und Kunkel
Lyophilisator Lycovac GT2	Fa. Vaccubrand
Mikrospitze Sonorex Sonoplus HD60	Fa. Bandelin
Mikrotom	Fa. Leitz
Paraffineinbutter Citadel 1000	Fa. Shandon
Schüttler Swip	Fa. Edmund Bühler
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Fa. BioRad
Ultracut E	Fa. Reichert und Jung
Ultrazentrifuge; Centrikon T1080; Rotor TFT 4594	Fa. Kontron
Ultrazentrifuge; TL-100	Fa. Beckmann
Wasserbad	Fa. Köttermann Labortechnik

### 4.1.4 Sonstiges

96well Flach- und Rundboden-Mikrotiterplatten	Fa. Nunc, Wiesbaden
Blutplatten, Columbia-Medium + 5% Hammelblut	Fa. bioMérieux, Marcy, Frankreich
Bottle Top Sterilfilter 0,2 Porengröße, SFCA	Fa. Nalge Nunc International Rochester, New York, USA
Dialyseschlauch Spectra Por Membran MWCO 6-8000	Fa. Roth; Karlsruhe
Dialyseschlauch ultraPure 12000-14000 D	Fa. Life Technologies, Paisley, Schotland
Dialyseschlauch Visking Typ 36/32	Fa. Roth

Einmalsterilfilter FP 30/0,2 CA-S (Porengröße 0,2 µm)	Fa. Schleicher und Schuell, Dassel
FP 030/2 (Porengröße 0,45 µm)	Fa. Schleicher und Schuell, Dassel
Filterpapier Whatman 41	Fa. Schleicher und Schuell, Dassel
Szintillationsflüssigkeit Betaplate Scint	Fa. Wallac, Milton Keynes, UK

## 4.2 Bakterienstämme

interne Bezeichnung	Serotyp	Bezeichnung	Ursprung	zur Verfügung von
5646	<i>C. jejuni</i> Penner 19			E. Lüneberg
5647	<i>C. jejuni</i> Lior 11			E. Lüneberg
5700	<i>S. typhimurium</i>			M. Frosch
5784	<i>C. jejuni</i> O:10	PG 836	MFS	J. Penner, Health Canada
5785	<i>C. jejuni</i> O:19	OH 4382	GBS	J. Penner, Health Canada
5786	<i>C. jejuni</i> O:19	OH 4384	GBS	J. Penner, Health Canada
5799	<i>C. jejuni</i> O:19	HB 93-13	GBS	I. Nachamkin

## 4.3 Bakterienanzucht

*C. jejuni*-Stämme wurden auf Blutplatten für 24 h unter mikroaeroben Bedingungen (10% CO<sub>2</sub>, 7% O<sub>2</sub>) bei 37 °C angezchtet. Nach diesen 24 h wurden die Platten in steriles PBS abgeerntet, die Bakteriensuspension erneut auf Blutplatten ausplattiert und für 48 h unter mikroaeroben Bedingungen bei 37 °C gezüchtet.

*Salmonella typhimurium* wurde ebenfalls auf Blutplatten kultiviert. Die Platten wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C für 48 h kultiviert.

Mit *C. jejuni* oder *S. typhimurium* bewachsene Blutplatten wurden mit sterilen Wattestäbchen in steriles PBS oder 0,9%ige NaCl-Lösung abgeerntet, wobei jeweils ca. 30 Platten in 20 ml Lösung überführt wurden.

## 4.4 Antigengewinnung

### 4.4.1 Bakteriengesamthomogenat

Die Bakteriensuspension in PBS aus 0 wurde für 4 x 30 sec mit je 10 sec Pause mit der Mikrospritze bei Stufe 3 im Eisbad beschallt. Die Bakteriensuspension wurde in einem Dialyseschlauch (12-14 kD) in einer 5%igen Natriumazid-Lösung für 62 h dialysiert. Anschließend wurde für 48 h in *Aqua bidest* unter mehrfachem Wasserwechsel dialysiert und danach die Probe steril aus dem Dialyseschlauch entnommen. Dann wurde das Bakterienhomogenat lyophilisiert und die Ausbeute durch Auswiegen bestimmt.

### 4.4.2 Äußere Membran-Proteine (OMPs)

benötigte Puffer: 10 mM Tris-Puffer pH 8

1,67% Sarkosyl in 11,1 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,6

Je 20 ml der Bakteriensuspension aus 0 wurden für 25 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml 10 mM Tris-Puffer pH 8 resuspendiert und für 4x 30 sec mit je 10 sec Pause mit der Mikrospritze bei Stufe 3 im Eisbad beschallt. Nicht zerstörte Zellen wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 3500 rpm und 4 °C abgetrennt und der Überstand anschließend für 60 min bei 20000 rpm und 4 °C erneut zentrifugiert. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus *Aqua bidest* und Sarkosyl in Tris-Puffer pH 7,6 im Verhältnis 1:8 aufgenommen und für 20 min bei RT durch mehrmaliges Schütteln extrahiert. Abschließend wurde für 90 min bei 30000 rpm bei 20 °C in der Beckmann Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in *Aqua bidest* gelöst und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

### 4.4.3 Fraktionen der äußeren Membran-Proteine

Elutionspuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,025% SDS

Für die Fraktionierung der OMPs wurden präparative Gele mit 20 x 20 cm gegossen. Für ein Gel war der doppelte Ansatz des Trenngels wie in 4.9 angegeben nötig. Aufgetragen wurden ca. 6 mg OMPs pro Gel und als Referenz diente vorgefärbter Marker. Anhand des Markers wurde das Gel wie folgt zerschnitten: direkt unterhalb der 40 kD-Bande und mittig zwischen den Banden bei 28 und 22 kD. Mit Hilfe einer



Biotrap-Elutionskammer wurden die Proteine aus dem Gel gelöst und anschließend eine Proteinbestimmung durchgeführt. Außerdem wurden die Fraktionen in analytischen SDS-Gelen auf ihre Reinheit untersucht.

#### **4.4.4 Lipopolysaccharide**

Die Bakteriensuspension aus 0 wurde für 20 min bei 6000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 10 ml 70 °C warmem *Aqua bidest* suspendiert. Nach Zugabe von 10 ml 90%igem Phenol, das ebenfalls 70 °C warm war, wurde 20 min bei 68 °C inkubiert und während dieser Zeit fünfmal gut gemischt. Dann wurde 15 min bei 5000 rpm bei RT zentrifugiert und die obere Phase abgenommen. Der Waschvorgang mit Phenol wurde wiederholt und die vereinigten LPS-Phasen wurden gegen *Aqua bidest* dialysiert bis kein Phenol-Geruch mehr wahrnehmbar war. Anschließend wurde das Dialysat lyophilisiert und ausgewogen.

#### **4.4.5 Pronase-Verdau von Lipopolysacchariden**

verwendetes Enzym: Pronase, Nuclease-frei aus *Streptomyces griseus*, Fa. Roche,  
Mannheim

Die Pronase wurde laut Beipackzettel gelöst, die empfohlene Stammlösung mit 20 mg/ml hergestellt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für den Verdau noch vorhandener Proteinbestandteile in der LPS-Präparation wurde eine LPS-Konzentration von 20 mg/ml eingestellt und die Pronase in einer Endkonzentration von 1 mg/ml dazugegeben. Über Nacht wurde im Wärmeschrank bei ca. 54 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die noch vorhandene Pronase für 20 min bei 80 °C im Wasserbad inaktiviert, das verdaute LPS gegen *Aqua bidest* im Dialyseschlauch (Porengröße 6-8 kD) dialysiert (wobei das Wasser mehrfach gewechselt wurde) und anschließend lyophilisiert.

#### **4.4.6 Myelinpräparation (BPM)**

benötigte Lösungen: 0,32 M Sucroslösung (4 °C)  
0,8 M Sucroslösung (4 °C)

Die Herstellung und Aufreinigung des Myelins des peripheren Nervensystems (PNS) aus Spinalwurzeln des Rindes erfolgte nach der Methode von Norton und Poduslo

(1973). 100 g präparierte Nervenwurzeln aus der *Cauda equina* von frisch geschlachteten Rindern wurden mit einem Ultraturax-T28 mit 900 ml kalter 0,32 M Sucroslösung auf Eis homogenisiert und zum Entfernen grober Gewebereste durch drei Lagen Gaze filtriert. Das Myelinhomogenat wurde anschließend über einen Sucrosegradienten gereinigt. Dazu wurden je 50 ml des Homogenates mit 15 ml 0,8 M Sucroslösung unterschichtet und 60 min in einer Kontron-Ultrazentrifuge bei 30000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Interphase aus Myelin wurde von restlichen Sucroseanteilen durch wiederholtes Waschen mit *Aqua bidest* gereinigt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet aus Myelin in 100 ml *Aqua bidest* aufgenommen, bei –80 °C tiefgefroren und im Lyophilisator gefriergetrocknet. Das lyophilisierte PNS Myelin wurde bei –80 °C aufbewahrt.

#### 4.4.7 Präparation des Myelinproteins P2 (P2-Protein)

Die Präparation von P2 erfolgte nach dem Schema der Myelinpräparation gemäß der Anleitung von Kitamura (Kitamura et al. 1976). Nach dem letzten Waschschrift wurde das Myelin in 100 ml *Aqua bidest* aufgenommen und nochmals 5 min mit dem Ultraturax homogenisiert. Danach erfolgte die Einstellung auf pH 2 im Homogenat. Die saure Extraktion lief über Nacht unter ständigem Rühren. Die Lösung wurde in der Ultrazentrifuge eine Stunde lang bei 15000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Danach dialysierte man den Überstand 7 Stunden gegen *Aqua bidest* 4 °C (Spectra Por Membran MXCO 6-8000) unter einmaligem Wasserwechsel. Das Dialysat wurde bei –80 °C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 2-3 ml *Aqua bidest* (pH 2) gelöst und mittels einer Säulenchromatographie aufgetrennt. Für die Aufreinigung von P2 verwendet man eine Sephadex 100-Säule, eingestellt auf pH 2. Die P2-Fractionen wurden gegen *Aqua bidest* dialysiert, bei –80 °C eingefroren und nach der Lyophilisierung bei –80 °C aufbewahrt.

Pro 100 g verarbeiteter peripherer Nerven erhält man eine Ausbeute von maximal 20 mg P2-Protein.

#### 4.4.8 Basisches Myelinprotein vom Meerschweinchen (GP-MBP)

Die Gewinnung des MBP erfolgte nach Eylar (Eylar et al. 1971). Gehirne von Meerschweinchen (50 g) wurden mit 125 ml kaltem Methanol (-20 °C) mit Hilfe des Ultraturrax homogenisiert. Nach Zugabe von 250 ml Chloroform (-20 °C) wurde das Gemisch mit dem Ultraturrax für weitere 4 min homogenisiert. Zum Abtrennen der zwei entstandenen Phasen füllt man das Homogenat in einen Scheidetrichter. Bei 4 °C bildeten sich nach 3-5 h zwei klar getrennte Phasen, oben eine trübe und unten eine klare Phase. Die untere klare Phase wurde verworfen und die obere trübe Phase mittels Vakuumpumpe in einen Büchnertrichter (180/110) mit Filterpapier Whatman 41 filtriert. Die auf dem Filter verbliebene Masse wurde mehrmals mit insgesamt 100-200 ml Aceton gewaschen, bis sie sandfarben aussah. Die getrocknete Masse wurde vom Filter mittels Spatel abgekratzt und mit 200 ml *Aqua bidest* homogenisiert. Das Homogenat wurde angesäuert (pH 2) und über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rühren extrahiert. Schließlich wurde der saure Extrakt bei 3000 rpm für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand mit Ammoniumhydroxid auf pH 5,5 eingestellt und bei 4 °C für 1 h gerührt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm für 30 min bei 4 °C erfolgte die Ammoniumsulfat-Fällung durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zur 50%-Sättigung (= 354 g/l umgerechnet auf das Gesamtvolumen). Nach 20 min Rühren wurde mit 5N Natronlauge auf pH 6 eingestellt und die Fällung unter ständigem Rühren über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde bei 3000 rpm für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet anschließend nochmals mit einer 50%igen Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Nach Resuspendieren des Pellets in 20 ml *Aqua bidest* versetzt man es mit 180 ml Aceton. Zur Fällung wird es mit 200 µl konzentrierter Salzsäure angesäuert und sofort in gläserne Zentrifugenröhrchen überführt, die zur Fällung bei RT max. 1 h stengelassen werden. Das weiße Koagulat wurde bei 1800 rpm für 20 min bei 4 °C, ohne die Zentrifugenröhrchen zu verschließen abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 30 ml *Aqua bidest* resuspendiert und in einem Dialyseschlauch (Visking Typ 36/32) gefüllt. Die Dialyse gegen *Aqua bidest* erfolgte bei 4 °C über Nacht. Das Dialysat wurde bei 1800 rpm für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand bei -80 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert.

## **4.5 Tierexperimentelle Methoden**

### **4.5.1 Versuchstiere**

Weibliche Lewis-Ratten wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) und weibliche Dark agouti (DA-)Ratten wurden von Harlan (Fa. Winkelmann; Borcheln) bezogen. Die Tiere waren zu Beginn der Versuche 6-8 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 130-160 g.

Das Blut der Versuchstiere war serologisch getestet worden, die Tiere waren frei von Infekten.

### **4.5.2 Induktion von oraler Toleranz**

Lewis-Ratten erhielten pro Fütterung 50 mg BPM. Das Antigen wurde oropharyngeal durch eine Kanüle verabreicht. Die Therapie wurde innerhalb von 10 Tagen jeden zweiten Tag, also insgesamt fünfmal, durchgeführt. Zur Bestimmung des Einflusses von *C. jejuni*-LPS wurden der Antigen suspension alternativ 2,5 mg Pronase-verdautes LPS beigemischt. Die Induktion der EAN erfolgte am Tag nach der letzten Fütterung. Als Kontrollen dienten Tiere, denen anstelle des Antigens lediglich PBS oral verabreicht wurde.

### **4.5.3 Induktion von aktiver experimenteller autoimmuner Neuritis (EAN)**

Die sogenannte aktive Myelin-EAN wurde durch die subkutane (s.c.) Injektion von je 50 µl einer Emulsion in die Hinterpfote induziert. Diese Emulsion bestand aus gleichen Volumina an PBS mit 3,75 mg BPM und komplettem Freund'schem Adjuvans (CFA) mit 25 µg *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

#### 4.5.4 Bewertung des Krankheitsgrades

Die Tiere wurden täglich gewogen und zur Beurteilung ihres Krankheitsgrades beobachtet. Die klinischen Krankheitsgrade wurden nach folgender Skala bewertet (Hartung et al. 1988a):

- 0 normal
- 1 reduzierter Schwanztonus, Schwanzspitze hängt
- 2 vollständige Schwanzlähmung
- 3 geringe Ataxie, etwas breitbeiniger Gang
- 4 Gangataxie, abnormale Stellreflexe / Haltungsreflexe
- 5 geringe Paraparese der Hinterbeine
- 6 mittelschwere Paraparese oder Plegie eines Beines
- 7 schwere Paraparese oder Paraplegie
- 8 Tetraparese
- 9 Tetraparese und Atemnot
- 10 Tod

## 4.6 Histologie

### 4.6.1 Perfusion und Präparation

benötigte Lösung: pro Ratte ca. 500 ml 4%ige PFA-Lösung in PBS, frisch herstellen  
Zur Perfusion wurden die Ratten durch CO<sub>2</sub>-Narkose getötet und entblutet. Nach Eröffnung des Thorax wurde die Kunststoffspitze einer Venenverweilkanüle mit angeschlossenem Dreiwegehahn in den linken Ventrikel eingeführt. Zunächst wurden die Tiere mit Hilfe eines Infusionsgerätes nur mit Ringerlösung, die 20000 U Heparin/l enthielt, gespült. Damit ein kontinuierlicher Durchfluß gewährleistet war, wurde bei Perfusionsbeginn der rechte Vorhof aufgeschnitten. Zur Fixierung des Gewebes wurden die Tiere dann mit 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Das Rückenmark mit den spinalen Wurzeln und der proximale *Nervus ischiadicus* wurden präpariert und für weitere 14 Stunden oder mehrere Tage mit den entsprechenden Fixationsmitteln (siehe unten) immersionsfixiert.

#### 4.6.2 Kunstharzeinbettung

benötigte Lösungen:

- 0,15 M Phosphatpuffer
- 2%iges Osmiumtetroxid in Daltonpuffer
- Daltonpuffer: 4% Kaliumdichromat 3,4% NaCl jeweils in Aqua dem. 1:1 mischen, mit KOH pH 7,4 einstellen
- 1 g Phosphorwolframsäure und 0,5 g Uranylacetat in 100 ml 70% Aceton lösen und filtrieren
- Einbettgemisch: 10 ml ERL-4206 (Vinylcyclohexendioxid)  
5 ml D.E.R. (Weichmacher, Dioxid)  
25 ml NASA (Härter, Nonylbernsteinsäureanhydrid)  
1 ml S-1 (DMAE) (Beschleuniger, Dimethylaminoethanol)  
alle Fa. Serva, Heidelberg

Gemisch 20-30 min gut auf dem Magnetrührer verrühren

- Acetonreihe (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%)

Für die Kunstharzeinbettung wurden die Präparate mit 2,5% Glutaraldehyd über Nacht nachfixiert. Das Fixans wurde dann mit 0,15 M Phosphatpuffer aus dem Gewebe gewaschen. Die Nachfixierung erfolgte mit 2%igem Osmiumtetroxid in Daltonpuffer für 2 h. Zum Auswaschen des Osmiums wurde wiederholt mit 0,15 M Phosphatpuffer gespült. Anschließend verblieb das Gewebe in diesem Puffer. Die Nervenstücke wurden mit Hilfe einer aufsteigender Acetonreihe (30%, 40%, 50%, 60%) dehydriert. Die Vorkontrastierung erfolgte durch Phosphorwolframsäure und Uranylacetat in 70% Aceton. Danach wurde die Acetonreihe fortgesetzt (80%, 90%, 100%). Das Gewebe wurde anschließend durch die Verringerung des Acetonanteils von 100% gegenüber dem Einbettungsgemisch durch Mischungsgang von 1:1 und 1:3 eingebettet. Schließlich verblieben die Präparate über Nacht in reinem Einbettungsgemisch. Danach kamen die Gewebeproben in Einbettkapseln und zur Polymerisation über Nacht bei 70 °C in den Wärmeschrank.

Für lichtmikroskopische Analysen wurde mit Glasmessern an einem Ultracut E Semidünnschnitte von 0,5 µm-Dicke angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgenommen und mit Toluidinblau angefärbt.

### 4.6.3 Paraffineinbettung

benötigte Lösungen: 0,2 M Phosphatpuffer

Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 96%, 100%)

1 M Tris-HCl-Puffer pH 8

Die Präparate wurden für die Paraffineinbettung durch wiederholtes Auswaschen mit 0,1 M Phosphatpuffer vom PFA befreit und verblieben bis zur endgültigen Einbettung in Phosphatpuffer bei 4 °C. Diese wurde mit Hilfe eines automatischen Paraffineinbeters durchgeführt: nach der Immersionsfixierung wurde das Gewebe gewässert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 96%, 2x 100%, jeweils 20 min) dehydriert. Zur Delipidisierung wurden die Gewebestücke mit einem 1:1 Gemisch aus 100%igem Ethanol : Chloroform (2x 30 min) und schließlich mit reinem Chloroform (2x 30 min) inkubiert. Anschließend erfolgte die Paraffinierung (1x 50 min, 1x 30 min) und die Einbettung in Plastikgießformen mit Hilfe eines Gewebeblocksystems. Nach Erkalten und Aushärten des Paraffins wurden mittels eines Mikrotoms 5 µm-Schnitte hergestellt. Diese wurden auf Objektträger, die 30 min mit einer Lösung aus 5 mg Poly-L-Lysine pro ml 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8) beschichtet worden waren, aufgezogen. Zur Adhäsion und Trocknung der Schnitte auf den Objektträgern wurden diese bei 37 °C über Nacht im Wärmeschrank getrocknet.

### 4.6.4 Hämalaun-Eosin-Färbung

benötigte Lösungen:

- 1%ige Eosinlösung in 70%igem Ethanol
- Hämalaun nach Mayer: 1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumiodat, 50 g Kaliumaluminiumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Citronensäure, in 1 l aqua dem. lösen und vor Gebrauch filtrieren
- Ethanolreihe (100%, 96%, 70%)
- Xylol

Zuerst wurden die nach 4.6.3 hergestellten Paraffinschnitte entparaffiniert (durch Eintauchen in Xylol (30 min), dann für je 2 min in 100%igen, 96%igen und 70%igen Ethanol) und anschließend mit aqua dem. gespült. Danach erfolgte die Färbung mit Hämalaun nach Mayer für 10 min. Nicht gebundene Färbelösung wurde anschließend durch 10 minütiges Wässern entfernt. Die Färbung mit Eosin wurde nur für 5 min

durchgeführt, zum Abschluß der Färbung wurde der Schnitt entwässert. Dies erfolgte in der umgekehrten Reihenfolge wie die Entparaffinierung durch Eintauchen für 3x 2 min in 70%igen, 2x 2 min in 96%igen, 2x 2 min in 100%igen Ethanol und abschließend für 2x 5 min in Xylol. Danach wurde mit VitroClud eingedeckelt.

#### 4.6.5 Immunzytochemie an Paraffinschnitten

benötigte Lösungen:

- Ethanolreihe (100%, 96%, 90%, 70%)
- Erstantikörper:
  - 15-6A1 (1:100)      gegen T-Zellen      Fa. Laboserv, Giessen
  - ED1 (1:1000)      gegen Makrophagen      Fa. Genzyme, Rüsselsheim
  - 15-8A2 (1:100)      gegen CD4      Fa. HyCult biotechnology
  - OX8 (1:50)      gegen CD8      Fa. Serotec
- Lösung zum Blockieren der endogenen POD: 0,25 M Natriumazid, 3% Wasserstoffperoxid in 100% Methanol
- DAKO StreptABCComplex/HRP Duet, Mouse/Rabbit Kit, Fa. DAKO, Hamburg
- DAB-Färbelösung: 10 mg DAB-Tablette in 10 ml 0,05 M Tris-Puffer lösen, mit 0,015% Wasserstoffperoxid versetzen, filtrieren

Die Paraffinschnitte, die wie unter 4.6.3 beschrieben hergestellt wurden, wurden durch Inkubation für 2x 15 min in 100% Xylol und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (2 min 100%igen, 2 min 96%igen, 2 min 70%igen Ethanol) dehydriert. Dann wurden die Schnitte in TBS 3x 2 min gewaschen, 30 min mit 10% BSA in PBS blockiert und mit den verschiedenen Erstantikörpern 1 h bei RT inkubiert. Eine mögliche endogene Peroxidaseaktivität wurde durch 10-minütige Inkubation in Blockierungslösung gehemmt. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit dem DAKO StreptABCComplex/HRP. Als Substrat für die Peroxidase wurde DAB verwendet. Die Schnitte wurden anschließend 20 sek mit Hämatoxylin gegengefärbt, mit Leitungswasser gespült, entwässert (2x 2 min in 70%igem, 2x 2 min in 90%igem, 2x 2 min in 96%igem, 3x 2 min in 100%igem Ethanol, 10 min in Xylol) und in VitroClud eingedeckelt.



## 4.7 Zellkultur

### 4.7.1 Sterilisation

Glasgeräte wurden 6 h bei 180 °C in einem Heißluftschrank sterilisiert. Thermolabile Medien und Antigenlösungen wurden über 0,2 µm Einmalsterilfilter filtriert. Die Sterilisation von bovinem Myelin und *C. jejuni*-Antigenen, die in der Zellkultur verwendet wurden, wurde wie folgt durchgeführt: 5 mg/ml BPM wurde in *Aqua bidest* suspendiert, in einen Visking Typ 36/32-Dialyseschlauch gefüllt und für 3 Tage gegen 2% Natriumazid dialysiert. Anschließend erfolgte eine 3-tägige Dialyse gegen *Aqua bidest*, wobei das *Aqua bidest* mehrfach gewechselt wurde.

### 4.7.2 Proliferationsassay

Für Proliferationsstudien wurden Lymphozyten oder Milzzellen, falls nicht anders vermerkt, in einer Konzentration von  $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml in 100 µl Medium und Antigen pro Vertiefung in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät. Alle getesteten Antigene wurden in einer Konzentration von 2,5-20 µg Antigen/ml Restimulationsmedium eingesetzt, die Proliferationstests erfolgten in Dreifachansätzen. Die Zellen wurden 48 h im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37 °C kultiviert und 16 Stunden nach Zugabe von 0,25 µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin/well (1 Ci = 37 Gbq) mit einem Betaplate 96-well harvester auf Glasfaser-Filter geerntet. Die im Filter gebundene, partiell radioaktiv markierte DNS wurde nach Zugabe der Szintillationsflüssigkeit mit einem Betaplate liquid scintillation counter gemessen.

## 4.8 Enzym-gekoppelter Immunoabsorptions-Assay (ELISA)

benötigte Lösungen:

- Boratpuffer: 6,185 g Borsäure, 9,54 g Natriumborat, 4,385 g NaCl lösen, auf pH 8,4 bis 8,5 einstellen und auf 1 l mit *Aqua bidest* auffüllen
- Caseinlösung: 25 g Casein in 800 ml 0,3 N NaOH geben, über Nacht bei 37 °C rühren, mit konz HCl auf pH 8,4 einstellen und mit *Aqua bidest* auf 1 l auffüllen
- ABTS-Substratpuffer: 0,1 M Citronensäure (wasserfrei), 0,1 M Natriumhydrogenphosphat, pH 4,6 in *Aqua bidest*

- Substratlösung: 25 mg ABTS in 50 ml ABTS-Substratpuffer lösen und mit 4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzen
- Waschpuffer: PBS, 0,05% Tween 20
- Zweit-Antikörper: Peroxidase-gekoppelter anti-Ratte IgG-Antikörper aus der Ziege (0,8 µg/ml) (Fa. Dianova)

Zum Nachweis von *Campylobacter*- und Myelin-spezifischen Antikörpern im Serum der Versuchstiere wurden die Vertiefungen von 96-well Maxisorb-Immunoplatten mit je 50 µl einer Lösung des Antigens in Boratpuffer (Konz.: 50 µg/ml) beschichtet und dazu über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde mit einem ELISA-washer die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 200 µl Caseinpuffer für 2 h bei RT blockiert. Danach wurde erneut dreimal gewaschen und dann die Seren aufgetragen. Als Kontrolle wurde normales Rattenserum (NRS) von nicht-immunisierten Ratten in den vier ersten Verdünnungen wie die Proben-Seren aufgetragen (1:4, 8, 16 und 32 oder 1:32, 64, 128 und 256). Die Proben wurden in PBS, 0,5% BSA, 0,05% Tween 20 von 1:4 oder 1:32 an aufwärts in Zweier-Schritten verdünnt und als Triplicate bestimmt. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde erneut dreimal gewaschen und danach der mit Peroxidase gekoppelte Zweit-Antikörper, verdünnt in Probenpuffer, aufgetragen. Dieser wurde ebenfalls für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde nochmals dreimal gewaschen und dann mittels Farbreaktion die Konzentration der Antikörper bestimmt. Dazu wurde in jedes well 100 µl Substrat pipettiert und je nach Farbentwicklung nach 15 oder 30 min die Absorption bei 405 nm gemessen.

Der spezifische Serum-Titer spiegelt die höchste Verdünnung des Serums wieder, bei der die Extinktion noch über derjenigen von naivem Rattenserum plus zweifacher Standardabweichung liegt.

#### 4.9 SDS-Gelelektrophorese

benötigte Lösungen:

- Probenpuffer: 0,5 ml 1 M Tris-Puffer pH 6,8; 4,5 ml *Aqua bidest*; 0,8 ml Glycerin; 1,6 ml 10%iges SDS; 0,4 ml β-Mercaptoethanol; 0,2 ml Bromphenolblau 0,05%
- Laufpuffer (für 2 Liter 10fach-Ansatz): 60,6 g Tris, 288,4 g Glycin in *Aqua bidest*; pH 8,3 einstellen, mit *Aqua bidest* auf 2 l auffüllen

- Comassie-Blau-Färbelösung: 2,5 g Comassie Brilliant Blue R250 in 500 ml Methanol, 500 ml *Aqua bidest* und 100 ml Essigsäure
- Entfärbelösung: 500 ml Methanol, 500 ml *Aqua bidest*, 100 ml Essigsäure
- vorgefärbter Marker (blaue Banden bei 195,9; 125,6; 89,4; 64,9(pink); 52,8; 39,8; 27,7; 21,8; 16,2; 9,0 kD); Fa. Gibco
- Gelansätze:

	<u>Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
<i>Aqua bidest</i>	3,3 ml	2 ml
30% Acrylamid	4 ml	0,5 ml
Trispuffer pH 8,8 1,5 M	2,5 ml	-
Trispuffer pH 6,8 1 M	-	0,38 ml
10% SDS	0,1 ml	0,03 ml
10% APS	0,1 ml	0,03 ml
TEMED	0,004 ml	0,003 ml

Zur Dokumentation der Reinheit der Proteinaufarbeitungen und als Vorstufe zum Western Blot wurde SDS-Page in Anlehnung an die Methode von Laemmli (1970) durchgeführt.

In einer Gelkammer wurden je 14 x 11,5 cm große 12,5%ige Trenngele gegossen. Das Sammelgel wurde direkt über das polymerisierende Trenngel gegossen. In dieses wurde ein Zehntaschenkamm gesteckt, der nach vollständiger Polymerisierung wieder entfernt wurde. Somit standen 10 Bahnen für die Probenauftragung zur Verfügung. Die Proteinproben wurden zu Konzentrationen von 2 bis 40 µg/10 µl *Aqua bidest* verdünnt und 1:1 mit Probenpuffer gemischt, wodurch die Konzentrationen pro Spur 1 bis 20 µg in 20 µl betragen. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 min gekocht. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde zusätzlich ein vorgefärbter Marker aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer gefüllt und für ein Gel wurde eine Stromstärke von 20 mA (bei zwei Gelen von 40 mA) bei konstanter Spannung am Spannungsgeber eingestellt. Die Dauer eines Elektrophoreselaufs betrug etwa eine Stunde.

Die Färbung der Proteinbanden erfolgte für 1 h in Comassie-Blau-Lösung unter Schütteln, wobei die nicht-Proteinanteile danach mit Entfärbelösung wieder auf dem Schüttler entfärbt wurden.

## 4.10 Herstellung monoklonaler Antikörper

### 4.10.1 B-Zell-Fusion

benötigter Puffer: Lysispuffer: 0,15 M Ammoniumchlorid, 1 mM Kaliumcarbonat, 0,1 mM EDTA; pH 7,2, mit *Aqua bidest* auffüllen

Für die Gewinnung antigen-sensitiverter Milzzellen wurden Balb/c-Mäuse mit einer Suspension aus 1 mg *C. jejuni*-LPS in 200 µl PBS und 200 µl CFA subcutan immunisiert. Danach wurde, jeweils im Abstand von 1½ Wochen, mit einer Suspension aus 1 mg *C. jejuni*-LPS in 200 µl PBS und IFA intraperitoneal geboostert. Drei Tage nach dem letzten Boostern wurde die Milz entnommen, homogenisiert und für 8 min bei 1200 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Lysispuffer aufgenommen, kräftig gemischt und 5 min bei RT lysiert. Zum Abstoppen der Lyse wurden 45 ml PBS zugegeben, die Zellen für 8 min bei 1200 rpm und 37 °C zentrifugiert, in 10 ml warmem RPMI aufgenommen und gezählt.

Ag8 Maus-Myelomzellen wurden aus Kulturschalen gesammelt, ebenfalls für 8 min bei 1200 rpm und 37 °C abzentrifugiert, in RPMI aufgenommen und gezählt.

Die Milz- und Ag8-Zellen wurden auf Zellbasis im Verhältnis 1:1 gemischt, mit warmem RPMI auf 50 ml aufgefüllt und für 7 min bei 1200 rpm und 37 °C abzentrifugiert. Zum Pellet wurde im 37 °C-Wasserbad tropfenweise und unter Schütteln in 1 min 1 ml warmes PEG 1500 gegeben. Anschließend wurden innerhalb von 2 min 2 ml warmes RPMI und danach innerhalb von 3 min 7 ml warmes RPMI unter Schütteln zugetropft. Die Zellen wurden für 8 min bei 1200 rpm und 37 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde durch schnelle Zugabe von RPMI mit 20% FCS gelöst, wobei ein erneutes Aufziehen des Mediums vermieden wurde. Mit einer Zellzahl von 100.000/well wurden die Zellen in 96well-Kulturplatten ausgesät.

Am ersten Tag wird zu den Zellen je 150 µl Medium mit 10% FCS und 1% HAT/well pipettiert. Je nach Wachstum nach ca. 3-6 Tagen wurde das Medium abgesaugt und erneut mit 10% FCS, 1% HAT aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und danach das HAT durch 1% HT im Medium ersetzt. Das Screening auf produzierende Klone wurde mittels ELISA wie in 4.10.2.1 erwähnt durchgeführt.

#### 4.10.2 Austestung der Antikörper-Reaktivität

Zur Austestung der Reaktivität der generierten monoklonalen Antikörper wurden die Hybridom-Zellen in komplettem RPMI mit 10% FCS in Kultur genommen und bis zum Absterben der Zellen im Brutschrank belassen um die Antikörperkonzentration zu erhöhen. Das mit Antikörper angereicherte Medium wurde bei 5000 rpm für 8 min bei 4 °C abzentrifugiert und als Überstand weiterverwendet.

##### 4.10.2.1 mittels ELISA

verwendete Zweit-Antikörper (beide Fa. Dianova)

- Peroxidase-gekoppelter anti-Maus IgG-Antikörper aus der Ziege (0,8 µg/ml)
- Peroxidase-gekoppelter anti-Maus IgM-Antikörper aus der Ziege (0,8 µg/ml)

Die Beschichtung der 96-well-Maxisorb-Immunoplatten erfolgte mit 50 µl/well Ethanol bzw. Antigen gelöst in Ethanol mit einer Konzentration von 50 µg/ml. Über Nacht dampfte der Ethanol bei RT ein und danach wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit PBS, 1% BSA für 2 h bei RT geblockt. Die Platten wurden dreimal mit Waschlösung (PBS, 0,05% Tween 20) gewaschen und dann 50 µl der Überstände, 1:1 oder 1:2 in PBS verdünnt, aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C und es wurde erneut dreimal gewaschen. Der zweite Antikörper wurde ebenfalls in 50 µl PBS aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Entwicklung des ELISAs wie in Abschnitt 4.7.

##### 4.10.2.2 mittels Western Blot mit Immunfärbung

benötigte Lösungen:

Blotpuffer: 20 ml Methanol, 70 ml *Aqua bidest*, 10 ml 10x Puffer

10x Puffer: 1,9 M Glycin, 25 mM Tris in *Aqua bidest*

Ponceau-S-Färbelösung (Fa. Sigma): 0,1% Ponceau-S in 5% Essigsäure

Waschlösung: PBS; 0,05% Tween 20

DAB-Tabletten (Fa. Sigma)

Nitrocellulose-Membran (Fa. Schleicher und Schüll)

Filterpapier

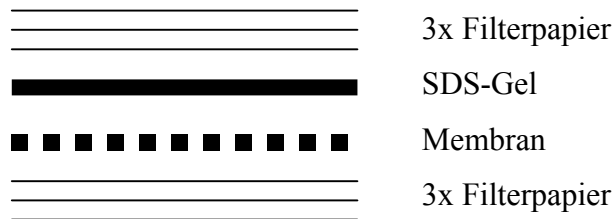


Bild 4.1: Aufbau eines Westernblots.

Zwischen zwei Kohleelektrodenplatten (hier: oben Anode, unten Kathode) werden wie dargestellt, in Puffer getränktes Filterpapier, Nitrocellulose und das SDS-Gel geschichtet.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine durch SDS-Page erfolgte die elektrische Übertragung der Proteine aus dem nicht gefärbten Gel auf Nitrocellulose (Towbin 1979).

Hierzu wurden 6 Blatt Filterpapier und eine Cellulose-Membran in Blotpuffer getränkt und wie in Bild 4.1 beschrieben mit dem SDS-Gel zwischen zwei Kohleelektroden einer Semi-dry-Kammer geschichtet. Luftblasen zwischen den Schichten wurden durch Ausrollen mit einer Pasteur-Pipette entfernt. Bei konstanter Spannung über 30 min mit 100 mA/Minigel wurden die Proteine auf die Nitrocellulose geblottet. Zur Kontrolle der Transfereffizienz wurde die Cellulose danach für 5 min in Ponceau-S-Färbelösung geschüttelt. Nach der anschließenden Entfärbung unter fließendem Wasser zeigten sich die transferierten Proteine als rote Banden, mit deren Hilfe auch die aufgetragenen Spuren gekennzeichnet werden konnten. Zur genauen Molekulargewichtsbestimmung wurden die bereits bei der SDS-Gel-Elektrophorese eingesetzten vorgefärbten Marker-Banden ebenfalls transferiert.

Die einzelnen Spuren wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und jeder so entstandene Nitrocellulosestreifen jeweils in eine Inkubationswanne gelegt. Diese wurden auf dem Schüttler mit jeweils 2 ml Waschpuffer für 1,5 h bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Über Nacht wurde pro Streifen mit 2 ml Hybridomüberstand (1:1 oder 1:2 mit PBS verdünnt) bei RT inkubiert und am nächsten Tag dreimal je 10 min mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Mit einem Zweitantikörper, in PBS verdünnt, wurde für weitere 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert und danach erneut dreimal je 10 min mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Währenddessen wurden DAB-Tabletten nach Vorschrift gelöst, zusätzlich mit 1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10 ml DAB-Lösung versetzt, und nach dem Waschen 2 ml der Färbelösung zu den Cellulosestreifen gegeben. Je nach Farbentwicklung wurden die Streifen nach 2 bis 10 min in *Aqua bidest* gewaschen und zwischen Papierhandtüchern getrocknet.

#### 4.10.2.3 mittles Dot Blot

benötigte Lösungen:

- Blockpuffer: PBS, 1% BSA
- Waschpuffer: PBS, 0,05% Tween 20
- Ganglioside GM1, GQ1b, GD1a, GT1b und GD1b (alle Fa. Sigma)
- Kontroll-Ig: Maus-IgG und Maus-IgM (beide Fa. Sigma)
- 2. AK Peroxidase-gekoppelter anti-Maus IgG-Antikörper aus der Ziege (0,8µg/ml)
- DAB-Tabletten (Fa. Sigma)
- Nitrocellulose-Membran (Fa. Schleicher und Schüll NC Pure 0,2 µm BA 83  
Nr. 41-00780)

Mit einer Mikroliterspritze wurden 1 µl pro Spot/Kästchen auf die Nitrosellulose aufgetragen, die Konzentration für die Ganglioside betrug dabei 0,5 µg/µl, für die Ig-Kontrollen 0,005 µg/µl, jeweils verdünnt in *Aqua bidest.* Über Nacht wurde die Nitrocellulose bei RT getrocknet. Die Streifen wurden für 2 h bei RT in je 2 ml Blockpuffer inkubiert und dabei geschüttelt. Der Puffer wurde abgesaugt und über Nacht wurde mit Hybridomüberstand als erstem Antikörper auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3 mal mit Waschpuffer gewaschen, mit dem 2. Antikörper (1:1000 verdünnt mit Waschpuffer) für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert und danach erneut dreimal mit je 2 ml Waschpuffer gewaschen. Währenddessen wurden DAB-Tabletten nach Vorschrift gelöst, zusätzlich mit 0,3% NiCO<sub>3</sub> versetzt, und nach dem Waschen 2 ml der Färbelösung zu den Cellulosestreifen gegeben. Je nach Farbentwicklung wurden die Streifen nach 2 bis 10 min in *Aqua bidest* gewaschen und zwischen Papierhandtüchern getrocknet.

#### 4.10.3 Isolierung des Antikörpers aus Kulturüberstand

benötigte Lösungen:

Puffer pH 8,9: 1 M Glycin, 1M NaCl, 50 mM Tris, 0,2% Natriumazid

Puffer pH 4,3: 0,05 M Natriumacetat, 0,15 M NaCl

Puffer pH 2,3: 0,05 M Glycin-HCl, 0,15 M NaCl

Eine ProteinA-Sepharose-Säule wurde mit ca. 200 ml Puffer pH 8,9 bei einem Fluß von 5 ml/min äquilibriert. Der Überstand aus Hybridom-Kulturen wurde mit den gleichen Chemikalien wie der Puffer pH 8,9 pro Liter versetzt und ebenfalls auf den pH 8,9

eingestellt. Dieser aufgearbeitete Überstand wurde mit einer möglichst kleinen Flußgeschwindigkeit (0,1 oder 0,2 ml/min), am besten über Nacht, auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde die Säule mit Puffer pH 8,9 solange gespült, bis der Indikator des Kulturmediums vollständig ausgewaschen war. Eluiert wurde mit Puffer pH 4,3 bei einem Fluß von 1,5 ml/min über einem Fraktionskollektor, wobei die einzelnen Fraktionen ein Volumen von je 4 ml hatten. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 280 nm, wobei positive Fraktionen vereinigt und gemeinsam gegen PBS dialysiert wurden.

Sollte mit Puffer pH 4,3 nach ca. 80 ml keine Elution erfolgt sein, wurde mit Puffer pH 2,3 eluiert.

## **4.11 Humane *C. jejuni*-spezifische T-Lymphozytenlinien**

### **4.11.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut und Primärstimulation mit *C. jejuni*-Antigen**

10 ml gerinnungsinaktiviertes peripheres Blut (EDTA-Blut) wurde 1:1 mit PBS verdünnt. Je 20 ml des verdünnten Blutes werden mit 10 ml Lymphoprep unterschichtet. Durch Zentrifugation für 20 min bei 1600 rpm und 20 °C erfolgte die Anreicherung von Monozyten und Lymphozyten in der Interphase. Diese Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit EH-Medium in einer Konzentration von 3 Mio Zellen/ml humanes Restimulations-Medium aufgenommen.

Die Aussaat der Zellsuspension erfolgte in 100 µl Aliquots in 96-well-Rundboden-Mikrotiterplatten. Die bakteriellen Antigene wurden in Endkonzentrationen von 5 oder 10 µg/ml Medium zugegeben. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C in einer feuchtigkeitsgesättigten und 5% CO<sub>2</sub> enthaltenden Atmosphäre inkubiert. Nach drei Tagen wurde zum Auswaschen des Antigens das Medium abgesaugt, mit 200 µl RPMI-Medium aufgefüllt, bei 1000 rpm für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Vorgang noch zweimal wiederholt. Nach dem dritten Waschschrift wurde das reine RPMI abgesaugt und durch 200 µl humanes IL-2-Medium ersetzt. Die weitere Versorgung der Zellen fand in Abständen von 3-4 Tagen durch Entfernung von 100 µl Medium und Zugabe von 100 µl frischem humanem IL-2-Medium statt. Nach 14 Tagen wurden die Kulturen antigenabhängig restimuliert.



#### **4.11.2 Erste antigenabhängige Restimulation von T-Zell-Kulturen**

Die Zellkulturen der Primärstimulation wurden zur Entfernung des IL-2-Mediums zweimal mit RPMI-Medium gewaschen, dazwischen bei 1000 rpm für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert, in 100 µl komplettes RPMI aufgenommen und pro Ausgangsvertiefung auf drei korrespondierende wells einer neuen 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte gesplittet. Als antigenpräsentierende Zellen wurden frische autologe periphere Blutleukozyten aus EDTA-Blut gewonnen (siehe 4.11.1) und mit 40 Gy bestrahlt. Die PBLs wurden in humanem Restimulationsmedium in einer Konzentration von 4 Mio Zellen/ml resuspendiert und in 50 µl Aliquots zu den gesplitteten T-Zellkulturen gegeben. Je zwei der korrespondierenden wells wurden mit dem bakteriellen Antigen (wie in der Primärstimulation 5 oder 10 µg/ml) versehen. Die T-Zellkulturen die in der Restimulation eine ausschließlich antigenabhängige Proliferation im Mikroskop zeigten, wurden weiter expandiert.

#### **4.11.3 Weitere Restimulationen zur Expansion der T-Zell-Linien**

Frische PBL's (EDTA-Blut) wurden wie im vorherigen Abschnitt beschrieben isoliert und bestrahlt. Die bestrahlten PBL's wurden in humanem Restimulationsmedium mit 4 Mio/ml aufgenommen und in 50 µl Aliquots auf 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach zweimaligem Waschen der T-Zellen in EH-Medium erfolgte die Resuspension der Zellen in humanem Restimulationsmedium und deren Zugabe zu den autologen Leukozyten in 50 µl Aliquots (Konzentration 0,8 Mio/ml). Die Zellen wurden mit 5 oder 10 µg/ml Antigen inkubiert. Der Abstand zu weiteren Restimulationen betrug 14 Tage.

#### **4.11.4 Proliferationsassay und Austestung der Restriktion**

verwendete Antikörper (alle Fa. Cymbus):

- anti-HLA-DP
- anti-HLA-DQ
- anti-HLA-DR
- anti-HLA-DP,DQ,DR

Proliferationsassays wurden zur Bestimmung der Spezifität der Zellen und ihrer Restriktion in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die getesteten

Antigene wurden in Konzentrationen von 1,25 - 20 µg/ml Restimulationsmedium eingesetzt, wobei Dreifachansätze erfolgten. Für die Proliferationstests wurden die Zellkonzentrationen der Restimulation (siehe 4.11.3) durch Verdünnung in Restim-Medium halbiert. Zur Austestung der Restriktion wurden Antikörper gegen MHC-Klasse II-Moleküle in einer Konzentration von 3 µg/ml zusammen mit spezifischem Antigen eingesetzt. Die Zellen wurden 48 h im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37 °C kultiviert und nach 16-stündiger Zugabe von 0,25 µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin / well mit einem Betaplate 96-well harvester auf Glasfaser-Filter geerntet. Die im Filter gebundene, partiell radioaktiv markierte DNS wurde nach Zugabe der Szintillationsflüssigkeit mit einem Betaplate liquid scintillation counter gemessen.

#### **4.11.5 Bestimmung des Phänotyps mittels Immun-Durchflußzytometrie**

benötigter Puffer: PAB-Puffer: 0,02% Natriumazid, 1% BSA in PBS

Antikörper: FITC-anti-TCR-α/β	Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg
FITC-anti-CD4	Fa. Immunotech, Hamburg
FITC-anti CD8	Fa. Immunotech, Hamburg

Die T-Zellen wurden während des IL-2-abhängigen Wachstums gefärbt. Pro Antikörper wurden 200.000 T-Zellen eingesetzt. Diese wurden in je 2 ml PAB-Puffer gewaschen, bei 1000 rpm 5 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen anschließend mit den Antikörpern für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach Absaugen des Überstandes in 300 µl PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte in einem FACScan-Gerät, wobei jeweils 5000 Zellen analysiert wurden.

## **4.12 Elektrophysiologische Untersuchungen**

Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden komplett in der Arbeitsgruppe von Frau Brigitte Buchwald durchgeführt (Methode siehe Buchwald et al 1998).

An einer neuromuskulären Endplatte im Mäusezwerchfell wurden über eine Makro-Patch-Clamp-Elektrode die präsynaptische Quantenfreisetzung sowie postsynaptische Effekte unter Einfluß verschiedener Rattenserien aus unseren Versuchen bzw. des monoklonalen Antikörpers N-14 bestimmt.

## 5 Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
AT-EAN	adoptiv transferierte EAN
BCM	bovines zentrales Myelin
BPM	bovines peripheres Myelin
BSA	bovines Serumalbumin
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
ConA	Concanavalin A
cpm	counts per minute (Zählergebnisse pro Minute)
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EAN	experimentelle autoimmune Neuritis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunoabsorptions-Assay
FACS	Fluoreszenz activated cell sorter
FCS	fötales Kälberserum
GBS	Guillain-Barré Syndrom
GM1	Monosialogangliosid GM1 von bovinem Gehirn
HAT	Mediumergänzung mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
HLA	humane Leukozyten-Antigene
HT	Mediumergänzung mit Hypoxanthin und Thymidin
IFA	inkomplettes Freund'sches Adjuvans
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal

---

i.v.	intravenös
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MBP	basisches Myelinprotein
MFS	Miller-Fisher Syndrom
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
MS	Multiple Sklerose
NRS	normales Rattenserum
n.u.	nicht untersucht
OD	optische Dichte
OMP	äußere Membranproteine
P2	basisches Protein im Myelin peripherer Nerven
PEG	Polyethylenglykol
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBL	periphere Blutlymphozyten
PHA	Phythämagglutinin
PNS	peripheres Nervensystem
PPD	Proteinextrakt von Mycobakterien
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodekylsulfat
SE	saurer Myelinextrakt
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor

## 6 Literatur

Allos, B.M. (2001) *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. *Clin.Infect.Dis.* 32, 1201-1206

Ang, C.W., Endtz, H.P., Jacobs, B.C., Laman, J.D., de Klerk, M.A., van der Meche, F.G.A., van Doorn, P.A. (2000) *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides from Guillain-Barré syndrome patients induce IgG anti-GM1 antibodies in rabbits. *J.Neuroimmunol.* 104, 133-138

Archelos, J.J., Mäurer, M., Jung, S., Toyka K.V., Hartung, H.P. (1993) Suppression of experimental allergic neuritis by an antibody to the intercellular adhesion molecule ICAM-1. *Brain* 116, 1043-1058

Arnason, B.G.W., Soliven, B. (1993) Acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. In Dyck, P.J., Thomas, P.K., Lambert, E.H., Bunge, R. (Eds) *Peripheral Neuropathy*, Philadelphia: Saunders, 1437-1497

Asbury, A.K., Arnason, B.G., Adams, R.D. (1969) The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis. Its role in pathogenesis. *Medicine Baltimore* 48, 173-215

Asbury, A.K., Cornblath, D.R. (1990) Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann. Neurol. Suppl.* 27, S21-S24

Aspinall, G.O., McDonald, A.G., Pang, H., Kurjanczyk, L.A., Penner, J.L. (1994) Lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* serotype O:19: structures of core oligosaccharide regions from the serostrain and two bacterial isolates from patients with the Guillain-Barre syndrome. *Biochemistry* 33, 241-249

Ballin, R.H., Thomas, P.K. (1969) Elektron microscope observations on demyelination and remyelination in experimental allergic neuritis, I. Demyelination. *J. Neurol. Sci.* 8, 1-18

Bansil, S., Mithen, F.A., Cook, S.D., Sheffet, A., Rohowsky-Kochan, C. (1991) Clinical correlation with serum-soluble interleukin-2 receptor levels in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 41, 1302-1305

Beckman, E.M., Porcelli, S.A., Morita, C.T., Behar, S.M., Furlong, S.T., Brenner, M.B. (1994) Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* 372, 691-694

Ben-Smith, A., Gaston, J.S., Barber, P.C., Winer, J.B. (1996) Isolation and characterisation of T lymphocytes from sural nerve biopsies in patients with Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 61, 362-368

- Ben-Smith, A., Goodall, J.C., Gaston, J.S.H., Winer, J.B. (1997) Stimulation of peripheral blood lymphocytes with *Campylobacter jejuni* generates a  $\gamma\delta$  T cell response in patients with Guillain-Barré syndrome. *Clin.Exp.Immunol.* 109, 121-126
- Berciano, J., Coria, F., Monton, F., Calleja, J., Figols, J., LaFarga, M. (1993) Axonal form of Guillain-Barré syndrome: evidence for macrophage-associated demyelination. *Muscle Nerv* 16, 744-751
- Berciano, J., Figols, J., García, A., Calle, E., Illa, I., LaFarga, M., Berciano, M.T. (1997) Fulminant Guillain-Barré syndrome with universal inexcitability of peripheral nerves: a clinicopathological study. *Muscle Nerv* 20, 846-857
- Black, R.E. Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P., Blaser, M.J. (1988) Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J.Infect.Dis.* 157, 472-479
- Blaser, M.J., Allos, B.M., Lang, D. (1997) Development of Guillain-Barré syndrome following *Campylobacter* infection. *J.Infect.Dis.* 176 (Suppl 2), S91
- Boucquey, D., Sindic, C.J., Lamy, M., Delmee, M., Tomasi, J.P., Laterre, E.C. (1991) Clinical and serological studies in a series of 45 patients with Guillain-Barre syndrome. *J.Neurol.Sci.* 104, 56-63
- Brosnan, C.F., Tansey, F.A. (1984) Delayed onset of experimental allergic neuritis in rats treated with resperin. *J.Neuropath.Exp.Neurol.* 43, 84
- Brosnan, C.F., Lyman, W.D., Tansey, F.A., Carter, T.H. (1985) Quantitation of mast cells in experimental allergic neuritis. *J.Neuropath.Exp.Neurol.* 44, 196-203
- Buchwald, B., Weishaupt, A., Toyka, K., Dudel, J. (1995) Immunoglobulin G from a patient with Miller-Fisher syndrome rapidly and reversibly depressed evoked quantal release at the neuromuscular junction of mice. *Neurosci.Lett.* 201, 163-166
- Buchwald, B., Weishaupt, A., Toyka, K., Dudel, J. (1998a) Pre- and postsynaptic blockade of neuromuscular transmission by Miller-Fisher syndrome IgG at mouse nerve terminals. *Eur.J.Neurosci.* 10, 281-290
- Buchwald, B., Dudel, J., Toyka, K.V. (1998b) Neuromuscular blockade by immunoglobulin G from patients with Miller-Fisher syndrome. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 841, 659-669
- Buchwald, B., Toyka, K.V., Zielasek, J., Weishaupt, A., Schweiger, S., Dudel, J. (1998c) Neuromuscular blockade by IgG antibodies from patients with Guillain-Barre syndrome: a macro-patch-clamp study. *Ann.Neurol.* 44, 913-922
- Buchwald, B., Bufler, J., Carpo, M., et al. (2001) Combined pre- and postsynaptic action of IgG antibodies in Miller Fisher syndrome. *Neurology* 56, 67-74

- Buchwald, B., Ahngari, R., Toyka, K.V. (2002) Differential blocking effects of the monoclonal anti-GQ1b-antibody and  $\alpha$ -Lafrotoxin in the absence of complement at the mouse neuromuscular junction. *NeuroscienceLetters*, in press
- Burns, J., Krasner, L.J., Rostami, A., Pleasure, D. (1986) Isolation of P2 protein-reactive T-cell lines from human blood. *Ann.Neurol.* 19, 391-393
- Carpenter, S. (1972) An ultrastructural study of an acute fatal case of Guillain-Barré syndrome. *J.Neurol.Sci.* 15, 125-140
- Chiba, A., Kusunoki, S., Shimizu, T., Kanazawa, I. (1992) Serum IgG antibody to ganglioside GQ1b is a possible marker of Miller Fisher syndrome. *Ann.Neurol.* 31, 677-6790
- Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J.P., Sternon, J. (1972) Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *J.Infect.Dis.* 125, 390-392
- Enders, U., Karch, H., Toyka, K.V., Michels, M., Zielasek, J., Pette, M., Heesemann, J., Hartung, H.P. (1993) The spectrum of immune responses to *Campylobacter jejuni* and glycoconjugates in Guillain-Barre syndrome and in other neuroimmunological disorders. *Ann.Neurol.* 34, 136-144
- Eylar, E.H., Kniskern, P.J., Jackson J.J. (1971) Myelin basic protein. *Meth.Enzymol.* 32, 323-341
- Feasby, T.E., Gilbert, J.J., Brown, W.F., Bolton, C.F., Hahn, A.F., Koopman, W.F., Zochodne, D.W. (1986) An acute axonal form of Guillain-Barré polyneuropathy. *Brain* 109, 1115-1126
- Fujimoto, S., Yuki, N., Itho, T., Amako, K. (1992) Specific serotype of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barré syndrome. *J.Infect.Dis.* 165, 183
- Garside, P., Mowat, A.M. (1997) Mechanisms of oral tolerance. *Crit.Rev.Immunol.* 17, 119-137
- Gaupp, S., Hartung, H.P., Toyka, K., Jung, S. (1997) Modulation of experimental autoimmune neuritis in Lewis rats by oral application of myelin antigens. *J.Neuroimmunol.* 79, 129-137
- Gaupp, S., Hartung, H.P., Toyka, K., Jung, S. (1997b) Oral tolerization to myelin antigen inhibits clinical deterioration in a new animal model of relapsing inflammatory neuropathy. *Immunology* 197 (2-4), 237
- Goodyear, C.S., O'Hanlon, G.M., Plomp, J.J., Wagner, E.R., Morrison, I., Veitch, J., Cochrane, L., Bullens, R.W., Molenaar, P.C., Conner, J., Willison, H.J. (1999) Monoclonal antibodies raised against Guillain-Barré syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides react with neuronal gangliosides and paralyze muscle-nerve preparations. *J.Clin.Invest* 104, 697-708

- Gorodezky, C., Varela, B., Castro-Escobar, L.E., Chavez-Negrete, A., Escobar-Gutierrez, A., Martinez-Mata, J. (1983) HLA-DR antigens in Mexican patients with Guillain-Barré syndrome. *J.Neuroimmunol.* 4, 1-7
- Griffin, J.W., Stoll, G. (1990) Makrophage responses in inflammatory demyelinating neuropathies. *Ann.Neurol.* 27 Suppl., S64-S68
- Griffin, J.W., Li, C.Y., Ho, T.W., Xue, P., Macko, C., Cornblath, D.R., Gao, C.Y., Yang, C., Tian, M., Mishu, B., McKhann, G.M., Asbury, A.K. (1995) Guillain-Barre syndrome in northern China: the spectrum of neuropathologic changes in clinically defined cases. *Brain* 118, 577-595
- Griffin, J.W., Li, C.Y., Ho, T.W., Tian, M., Gao, C.Y., Xue, P., Mishu, B., Cornblath, D.R., Macko, C., McKhann, G.M., Asbury, A.K. (1996) Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barre syndrome. *Ann.Neurol.* 39, 17-28
- Griffin, J.W., Li, C.Y., Macko, C., Ho, T.W., Hsieh, S.T., Xue, P., Wang, F.A., Cornblath, D.R., McKhann, G.M., Asbury, A.K. (1996b) Early nodal changes in the acute motor axonal neuropathy pattern of the Guillain-Barré syndrome. *J.Neurocytol.* 25, 33-51
- Guillain, G., Barré, J., Strohl, A. (1916) Sur un syndrome de radiculoneurite avec hyperalbuminose du liquide cephalo-radichien sans reaction cellulaire. Remarques sur les caracteres cliniques et graphique de reflexes tendineux. *Bull.Soc.Med.* 40, 1462-1470
- Guillain-Barré Syndrome Study Group (1985) Plasmapheresis and acute Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 35, 1096-1104
- Günther, E., Walter, L. (2000) Comparative genomic aspects of rat, mouse and human MHC class I gene regions. *Cytogenet Cell Genet* 91, 107-112
- Hadden, R.D.M., Gregson, N.A., Hughes, R.A.C. (1999) Opening of the blood-nerve barrier in experimental autoimmune neuritis. *Ann.Neurol.* 46, 484-485
- Hadden, R.D.M., Gregson, N.A., Gold, R., Willison, H.J., Hughes, R.A.C. (2001a) Guillain-Barré syndrome serum and anti-*Campylobacter* antibody do not exacerbate experimental autoimmune neuritis. *J.Neuroimmunol.* 119, 306-316
- Hadden, R.D., Karch, H., Hartung, H.P., Zielasek, J., Weissbrich, B., Schubert, J., Weishaupt, A., Cornblath, D.R., Swan, A.V., Hughes, R.A., Toyka, K.V. (2001b) Preceding infections, immune factors, and outcome in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 56, 758-765
- Hafer-Macko, C., Hsieh, S.T., Li, C.Y., Ho, T.W., Sheikh, K., Cornblath, D.R., McKhann, G.M., Asbury, A.K. (1996) Acute motor axonal neuropathy: an antibody-mediated attack on axolemma. *Ann.Neurol.* 40, 635-644
- Hahn, A.F., Feasby, T.E., Gilbert, J.J. (1985) Blood-nerve-barrier studies in experimental allergic neuritis. *ActaNeuropathol.* 68, 101-109



- Hahn, A.F., Feasby, T.E., Steele, A., Lovgren, D.S., Berry, J. (1988) Demyelination and axonal degeneration in Lewis rat experimental allergic neuritis depend on the myelin dosage. *Lab.Invest.* 59, 115-123
- Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., Ullmann, U. (2001) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 3. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag
- Hartung, H.P., Schaefer, B., Heininger, K., Stoll, G., Toyka, K.V. (1988a) The role of macrophages and eicosanoides in the pathogenesis of experimental allergic neuritis. Serial clinical, electrophysiological, biochemical and morphological observations. *Brain* 111, 1039-1059
- Hartung, H.P., Heininger, K., Schäfer, B., Fierz, W., Toyka, K.V. (1988b) Immune mechanisms in inflammatory polyneuropathy. *Ann.NYAcad.Sci.* 540, 122-161
- Hartung, H.P., Schafer, B., Heininger, K., Toyka, K.V. (1988c) Suppression of experimental autoimmune neuritis by the oxygen radical scavengers superoxide dismutase and catalase. *Ann.Neurol.* 23, 453-460
- Hartung, H.P., Toyka, K.V. (1990) T-cell and macrophage activation in experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barré syndrome. *Ann.Neurol.* 27 Suppl., S57-S63
- Hartung, H.P., Stoll, G., Toyka, K.V. (1993) Immune reactions in the peripheral nervous system. In Dyck, P.J., Thomas, P.K., Griffin, J.W., Low, P.A., Poduslo, J.F. (Eds), *Peripheral Neuropathies*, Philadelphia, Saunders, 418-444
- Hartung, H.P., Pollard, J.D., Harvey, G.K., Toyka, K.V. (1995a) Immunopathogenesis and treatment of the Guillain-Barre syndrome--Part I. *Muscle Nerve* 18, 137-153
- Hartung, H.P., Pollard, J.D., Harvey, G.K., Toyka, K.V. (1995b) Immunopathogenesis and treatment of the Guillain-Barre syndrome--Part II. *Muscle Nerve* 18, 154-164
- Hemmer, B., Fleckenstein, B.T., Vergelli, M., Jung, G., McFarland, H., Martin, R., Wiesmüller, K.H. (1997) Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J.Exp.Med.* 185, 1651-1659
- Hickey, W.F., Hsu, B.L., Kimura, H. (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J.Neurosci.Res.* 28, 254-260
- Ho, T.W., Mishu, B., Li, C.Y., Gao, C.Y., Cornblath, D.R., Griffin, J.W., Asbury, A.K., Blaser, M.J., McKhann, G.M. (1995) Guillain-Barre syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 118, 597-605
- Ho, T.W., McKhann, G.M., Griffin, J.W. (1998) Human autoimmune neuropathies. *Annu.Rev.Neurosci.* 21, 187-226

- Ho, T.W., Willison, H.J., Nachamkin, I., Li, C.Y., Veitch, J., Ung, H., Wang, G.R., Liu, R.C., Cornblath, D.R., Asbury, A.K., Griffin, J.W., McKhann, G.M. (1999) Anti-GD1a antibody is associated with axonal but not demyelinating forms of Guillain-Barre syndrome. *Ann.Neurol.* 45, 168-173
- Hughes, R.A., Kadlubowski, M., Gray, I.A., Leibowitz, S. (1981) Immune responses in experimental allergic neuritis. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 44, 565-569
- Hughes, R.A.C. (Ed): *Guillain-Barré-Syndrom* (1990) London: Springer, 49-81
- Hughes, R.A., Rees, J.H. (1997) Clinical and epidemiologic features of Guillain-Barre syndrome. *J.Infect.Dis.* 176 Suppl 2, S92-S98
- Hughes, R.A.C., Hadden, R.D.M., Gregson, N.A., Smith, K.J. (1999) Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *J.Neuroimmunol.* 100, 74-97
- Ilyas, A.A., Willison, H.J., Quarles, R.H., Jungalwala, F.B., Cornblath, D.R., Trapp, B.D., Griffin, J.W., McKhann, G.M. (1988) Serum antibodies to gangliosides in Guillain-Barré syndrome. *Ann. Neurol.* 23, 440-447
- Ilyas, A.A., Mithen, F.A., Chen, Z.W., Cook, S.D. (1992) Anti-GM1 IgA antibodies in Guillain-Barre syndrome. *J.Neuroimmunol.* 36, 69-76
- Izumo, S., Linington, C., Wekerle, H., Meyermann, R. (1985) Morphologic study on experimental allergic neuritis mediated by T cell line specific for bovine P2 protein in Lewis rats. *Lab.Invest.* 53, 209-218
- Jackson, C.E., Barohn, R.J., Mendell, J.R. (1993) Acute paralytic syndrome in three American men. Comparison with Chinese cases. *Arch.Neurol.* 50, 732-735
- Jacobs, B.C., Endtz, H.P., van der Meche, F.G.A., Hazenberg, M.P., Achtereekte, H.A.M., van Doorn, P.A. (1995) Serum anti-GQ1b IgG antibodies recognize surface epitopes on *Campylobacter jejuni* from patients with Miller Fisher syndrome. *Ann.Neurol.* 37, 260-264
- Jacobs, B.C., van Doorn, P.A., Schmitz, P.I., Tio-Gillen, A.P., Herbrink, P., Visser, L.H., Hooijkass, H., van der Meche, F.G. (1996) *Campylobacter jejuni* infections and anti-GM1 antibodies in Guillain-Barre syndrome. *Ann.Neurol.* 40, 181-187
- Jung, S., Huitinga, I., Schmidt, B., Zielasek, J., Dijkstra, C.D., Toyka, K.V., Hartung, H.P. (1993) Selective elimination of macrophages by dichlormethylene diphosphonate-containing liposomes suppresses experimental autoimmune neuritis. *J. Neurol. Sci.* 119, 195-202
- Kaslow, R.A., Sullivan-Bolyai, J.Z., Hafkin, B., Schonberger, L.B., Kraus, L., Moore, M.J., Yunis, E., Williams, R.M. (1984) HLA antigens in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 34, 240-242
- Ketley, J.M. (1997) Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiol.* 143, 5-21

- Khalili-Shirazi, A., Gregson, N.A., Londei, M., Summers, L., Hughes, R.A. (1998) The distribution of CD1 molecules in inflammatory neuropathy. *J.Neurol.Sci.* 158, 154-163
- King, E.O. (1957) Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J.Infect.Dis.* 101, 119-128
- King, R.H., Craggs, R.I., Gross, M.L., Tompkins, C., Thomas, P.K. (1983) Suppression of experimental allergic neuritis by Cyclosporin-A. *ActaNeuropathol.* 59, 262-268
- Kitamura, K., Suzuki, M., Uyemura, K. (1976) Purification and partial characterization of two glycoproteins in bovine peripheral nerve myelin membrane. *Biochem.Biophys.Acta* 455, 806-816
- Koga, M., Yuki, N., Takahashi, M., Saito, K., Hirata, K. (1998a) Close association of IgA anti-ganglioside antibodies with antecedent Campylobacter jejuni infection in Guillain-Barre and Fisher's syndromes. *J.Neuroimmunol.* 81, 138-143
- Koga, M., Yuki, N., Kashiwase, K., Tadokoro, K., Juji, T., Hirata, K. (1998b) Guillain-Barré and Fisher's syndromes subsequent to Campylobacter jejuni enteritis are associated with HLA-B54 and Cw 1 independent of anti-ganglioside antibodies. *J.Neuroimmunol.* 88, 62-66
- Koga, M., Yuki, N., Hirata, K. (1999) Antiganglioside antibody in patients with Guillain-Barré syndrome who show bulbar palsy as an initial symptom. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 66,513-516
- Koga, M., Yuki, N., Hirata, K. (2001) Antecedent symptoms in Guillain-Barre syndrome: an important indicator for clinical and serological subgroups. *ActaNeurol.Scand.* 103, 278-287
- Kornberg, A.J., Pestronk, A., Bieser, K., Ho, T.W., McKhann, G.M., Wu, H.S., Jiang, Z. (1994) The clinical correlates of high-titer IgG anti-GM1 antibodies. *Ann.Neurol.* 35, 234-237
- Koski, C.L., Sanders, M.E., Swoveland, P.T., Lawely, T.S., Shin, M.L., Frank, M.M., Joiner, K.A. (1987) Activation of terminal components of complement in patients with Guillain-Barré syndrome and other demyelinating neuropathies. *J.Clin.Invest.* 84, 1492-1497
- Koski, C.L., Chou, E.H.K., Jungalwala, F.B. (1989) Anti-peripheral nerve myelin antibodies in Guillain-Barré syndrome bind to a neutral glycolipid of peripheral myelin and crossreact with Forssman antigen. *J.Clin.Invest.* 84, 280-287
- Kuroki, S., Saida, T., Nukina, M., Haruta, T., Yoshioka, M., Kobayashi, Y., Nakanishi, H. (1993) Campylobacter jejuni strains from patients with Guillain-Barre syndrome belong mostly to Penner serogroup 19 and contain beta-N-acetylglucosamine residues. *Ann.Neurol.* 33, 243-247
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

- Lampert, P.W. (1969) Mechanism of demyelination in experimental allergic neuritis. Electron microscopic studies. *Lab.Invest.* 20, 127-138
- Landry, O. (1859) Note sur la paralysie ascendente aigue, *Gaz.Hebd.Med.Chir.* 6, 472-474
- Lastovica, A.J., Goddard, E.A., Argent, A.C. (1997) Guillain-Barre syndrome in South Africa associated with *Campylobacter jejuni* O:41 strains. *J.Infect.Dis.* 176 Suppl 2, S139-S143
- Li, C.Y., Xue, P., Tian, W.Q., Liu, R.C., Yang, C. (1996) Experimental *Campylobacter jejuni* infection in the chicken: an animal model of axonal Guillain-Barre syndrome. *J.Neurol. Neurosurg.Psychiatry* 61, 279-284
- Linington, C., Lassmann, H., Ozawa, K., Kosin, S., Mongan, L. (1992) Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family as tissue-specific autoantigens: induction of experimental allergic neuritis (EAN) by P0 protein-specific T cell lines. *Eur.J.Immunol.* 22, 1813-1817
- Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., Laroche, L.J., Gill, P. (1982) Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J.Clin.Microbiol.* 15, 761-768
- Lunn, M.P., Johnson, L.A., Fromholt, S.E., Itonori, S., Huang, J., Vyas, A.A., Hildreth, J.E., Griffin, J.W., Schnaar, R.L., Sheikh, K.A. (2000) High-affinity anti-ganglioside IgG antibodies raised in complex ganglioside knockout mice: reexamination of GD1a immunolocalization. *J.Neurochem.* 75, 404-412
- Löffel, N.B., Rossi, L.N., Mumenthaler, M., Lutschg, J., Lundin, H.P. (1977) The Landry-Guillain-Barré syndrome: complications, prognosis and natural history of 123 cases. *J.Neurol.Sci.* 33, 71-79
- Ma, J.J., Nishimura, M., Mine, H., Kuroki, S., Nukina, M., Ohta, M., Saji, H., Obayashi, H., Saida, T., Kawakami, H., Uchiyama, T. (1998) HLA and T-cell receptor gene polymorphisms in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 51, 379-384
- McFadyean, F., Stockman, S. (1913) Report of the Departmental Committee Appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to Enquire into Epizootic Abortion, III. London: HMSO
- McKhann, G.M., Cornblath, D.R., Griffin, J.W., Ho, T.W., Li, C.Y., Jiang, Z., Wu, H.S., Zhaori, G., Liu, Y., Jou, L.P., Liu, T.C., Gao, C.Y., Mao, J.Y., Blaser, M.J., Mishu, B., Asbury, A.K. (1993) Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute flaccid paralysis in China. *Ann.Neurol.* 33, 333-342
- Mishu, B., Ilyas, A.A., Koski, C.L., Vriesendorp, F., Cook, S.D., Mithen, F.A., Blaser, M.J. (1993) Serologic evidence of previous *Campylobacter jejuni* infection in patients with the Guillain-Barre syndrome. *Ann.Intern.Med.* 118, 947-953

- Monos, D.S., Papaioakim, M., Ho, T.W., Li, C.Y., McKhann, G.M. (1997) Differential distribution of HLA alleles in two forms of Guillain-Barre syndrome. *J.Infect.Dis.* 176 Suppl 2, S180-S182
- Moran, A.P., O'Malley, D.T. (1995) Potential role of lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* in the development of Guillain-Barré syndrome. *J.Endotoxin.Res.* 2, 233-235
- Moran, A.P., Prendergast, M.M., Appelmelk, B.J. (1996) Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharide and its contribution to disease. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 16, 105-115
- Moran, A.P., Prendergast, M.M. (2001) Molecular mimicry in *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides: contribution of gastrointestinal infections to autoimmunity. *J.Autoimmun.* 16, 241-256
- Moran, A.P., Prendergast, M.M., Hogan, E.L. (2002) Sialosyl-galactose: a common denominator of Guillain-Barre and related disorders? *J.Neurol.Sci.* 196, 1-7
- Nachamkin, I., Allos, B. M., Ho, T. (1998) *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. *Clin.Microbiol.Rev.* 11, 555-56
- Nachamkin, I., Engberg, J., Gutacker, M., Meinersman, R.J., Li, C.Y., Arzate, P., Teeple, E., Fussing, V., Ho, T.W., Asbury, A.K., Griffin, J.W., McKhann, G.M., Piffaretti, J.-C. (2001) Molecular population genetic analysis of *Campylobacter jejuni* HS:19 associated with Guillain-Barré syndrome and gastroenteritis. *J.Inf.Dis.* 184, 221-226
- Olee, T., Powers, J.M., Brostoff, S.W. (1988) A t cell epitope for experimental allergic neuritis. *J. Neuroimmunol.* 19, 167-173
- Olee, T., Powell, H.C., Brostoff, S.W. (1990) New minimum length requirement for a T cell epitope for experimental allergic neuritis. *J.Neuroimmunol.* 27, 187-190
- Paparounas, K., O'Hanlon, G.M., O'Leary, C.P., Rowan, E.G., Willison, H.J. (1999) Anti-ganglioside antibodies can bind peripheral nerve nodes of Ranvier and activate the complement cascade without inducing acute conduction block in vitro. *Brain* 122, 807-816
- Penner, J.L., Hennessy, J.N. (1980) Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J.Clin.Microbiol.* 12, 732-737
- Penner, J.L., Aspinall, G.O. (1997) Diversity of lipopolysaccharide structures in *Campylobacter jejuni*. *J.Infect.Dis.* 176 Suppl 2, S135-S138
- Plomp, J.J., Molenaar, P.C., O'Hanlon, G.M., Jacobs, B.C., Veitch, J., Daha, M.R., van Doorn, P.A., van der Meche, F.G., Vincent, A., Morgan, B.P., Willison, H.J. (1999) Miller Fisher anti-GQ1b antibodies: alpha-latrotoxin-like effects on motor end plates. *Ann.Neurol.* 45, 189-199

- Pollard, J.D., Baverstock, J., McLeod, J.G. (1987) Class II antigen expression and inflammatory cells in Guillain-Barré syndrome. *Ann.Neurol.* 21, 337-341
- Powell, H.C., Olee, T., Brostoff, S.W., Mizisin, A.P. (1991) Comparative histology of experimental allergic neuritis induced with minimum length neuritogenic peptides by adoptive transfer with sensitized cells or direct sensitization. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 56, 658-674
- Prendergast, M.M., Moran, A.P. (2000) Lipopolysaccharides in the development of the Guillain-Barré syndrome and Miller Fisher syndrome forms of acute inflammatory peripheral neuropathies. *J.Endotoxin.Res.* 6, 341-359
- Prineas, J.W.(1981) Pathology of the Guillain-Barré syndrome. *Ann.Neurol.* 9 Suppl, 6-19
- Rees, J.H., Gregson, N.A., Hughes, R.A. (1995a) Anti-ganglioside GM1 antibodies in Guillain-Barre syndrome and their relationship to *Campylobacter jejuni* infection. *Ann.Neurol.* 38, 809-816
- Rees, J.H., Soudain, S.E., Gregson, N.A., Hughes, R.A. (1995b) *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. *N.Engl.J.Med.* 333, 1374-1379
- Rees, J.H., Vaughan, R.W., Kondeatis, E., Hughes, R.A. (1995c) HLA-class II alleles in Guillain-Barre syndrome and Miller Fisher syndrome and their association with preceding *Campylobacter jejuni* infection. *J.Neuroimmunol.* 62, 53-57
- Ritter, G., Fortunato, S.R., Cohen, L., Noguchi, Y., Bernard, E.M., Stockert, E., Old, L.J. (1996) Induction of antibodies reactive with GM2 ganglioside after immunization with lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni*. *Int.J.Cancer* 66, 184-190
- Ropper, A.H. (1992) The Guillain-Barré syndrome, *N.Engl.J.Med.* 326, 1130-1136
- Rosat, J.P., Grant, E.P., Beckman, E.M., Dascher, C.C., Sieling, P.A., Frederique, D., Modlin, R.L., Porcelli, S.A., Furlong, S.T., Brenner, M.B. (1999) CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8<sup>+</sup> alpha beta T cell pool. *J.Immunol.* 162, 366-371
- Rostami, A., Gregorian, S.K., Brown, M.J., Pleasure, D.E. (1990) Induction of severe experimental autoimmune neuritis with a synthetic peptide corresponding to the 53-78 amino acid sequence of the myelin P2 protein. *J.Neuroimmunol.* 30, 145-151
- Rostami, A.M. (1997) P2-reactive T cells in inflammatory demyelination of the peripheral nerve. *J.Infect.Dis.* 176 Suppl 2, S160-S163
- Salloway, S., Mermel, L.A., Seamans, M., Aspinall, G.O., Nam-Shin, J.E., Kurjanczyk, L.A., Penner, J.L. (1996) Miller-Fisher syndrome associated with *Campylobacter jejuni* bearing lipopolysaccharide molecules that mimic human ganglioside GD3. *Infect.Immun.* 64, 2945-2949

- Sanders, M.E., Koski, C.L., Robbins, D., Shin, M.L., Frank, M.M., Joiner, K.A. (1986) Activated terminal complement in cerebrospinal fluid in Guillain-Barré syndrome and multiple sclerosis. *J.Immunol.* 136, 4456-4459
- Sawant-Mane, S., Clark, M.B., Koski, C.L. (1991) In vitro demyelination by serum antibody from patients with Guillain-Barre syndrome requires terminal complement complexes. *Ann.Neurol.* 29, 397-404
- Sawant-Mane, S., Estep, A. 3<sup>rd</sup>, Koski, C.L. (1994) Antibody of patients with Guillain-Barre syndrome mediates complement-dependent cytolysis of rat Schwann cells: susceptibility to cytolysis reflects Schwann cell phenotype. *J.Neuroimmunol.* 49, 145-152
- Schmidt, B., Stoll, G., Hartung, H.P., Heininger, K., Schäfer, B., Toyka, K.V. (1990) Macrophages but not Schwann cells express Ia antigen in experimental autoimmune neuritis. *Ann.Neurol.* 28, 70-77
- Shamshiev, A., Donda, A., Carena, I., Mori, L., Kappos, L., De Libero, G. (1999) Self glycolipids as T-cell autoantigens. *Eur.J.Immunol.* 29, 1667-1675
- Sheth, R.D., Riggs, J.E., Hobbs, G.R., Gutman, L. (1996) Age and Guillain-Barré syndrome severity. *MuscleNerve* 19, 375-377
- Sieling, P.A., Chatterjee, D., Porcelli, S.A., Prigozy, T.I., Mazzaccaro, R.J., Soriano, T., Bloom, B.R., Brenner, M.B., Kronenberg, M., Brennan, P.J., Modlin, R.L. (1995) CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 269, 227-230
- Smith, M.E., Forno, L.S., Hofmann, W.W. (1979) Experimental allergic neuritis in the Lewis rat. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 38, 377-391
- Sugita, K., Ishii, M., Takanashi, J., Niimi, H., Yuki, N. (1994) Guillain-Barre syndrome associated with IgM anti-GM1 antibody following *Campylobacter jejuni* enteritis. *Eur.J.Pediatr.* 153, 181-183
- Sumner, A., Said, G., Idy, I., Metral, S. (1982) Syndrome de Guillain-Barre. *Rev.Neurol.* 138, 17-24
- Suzuki, M., Kitamura, K., Sakamoto, Y., Uyemura, K. (1982) The complete amino acid sequence of human P2 protein. *J.Neurochem.* 39, 1759-1762
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electroporetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 76, 4350-4354
- van der Meché, F.G.A., Schmitz, P.I.M., The dutch Guillain-Barré Syndrome Study Group (1992) A randomized trial comparing intravenous immune globulin and plasma exchange in Guillain-Barré syndrome. *N.Eng.J.Med.* 326, 1123-1129

- van der Meche, F.G., van Doorn, P.A., Meulstee, J., Jennekens, F.G. (2001) Diagnostic and classification criteria for the Guillain-Barre syndrome. *Eur.Neurol.* 45, 133-139
- von Wulffen, H., Hartard, C., Schaerin, E. (1994) Seroreactivity to *Campylobacter jejuni* and gangliosides in patients with Guillain-Barré syndrome. *J.Infect.Dis.* 170, 828-833
- Vriesendorp, F.J., Mishu, B., Blaser, M.J., Koski, C.L. (1993) Serum antibodies to GM1, GD1b, peripheral nerve myelin, and *Campylobacter jejuni* in patients with Guillain-Barre syndrome and controls: correlation and prognosis. *Ann.Neurol.* 34, 130-135
- Waksman, B.H., Adams, R.D. (1955) Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants. *J.Exp.Med.* 102, 213-236
- Waksman, B.H., Adams, R.D. (1956) A comparative study of EAN in the rabbit, guinea-pig and mouse. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 15, 293-310
- Walker, R.I., Caldwell, M.B., Lee, E.C., Guerry, P., Trust, T.J., Ruiz-Palacios, G.M. (1986): Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiol.Rev.* 50, 81-94
- Walsh, F.S., Cronin, M., Koblar, S., Doherty, P., Winer, J., Leon, A., Hughes, R.A. (1991) Association between glycoconjugate antibodies and *Campylobacter* infection in patients with Guillain-Barre syndrome. *J.Neuroimmunol.* 34, 43-51
- Weishaupt, A., Giegerich, G., Jung, S., Gold, R., Enders, U., Pette, M., Hayasaka, K., Hartung, H.P., Toyka, K.V. (1995) T cell antigenic and neurotogenic activity of recombinant human peripheral myelin P2 protein. *J.Neuroimmunol.* 63, 149-156
- Winer, J.B., Hughes, R.A., Anderson, M.J., Jones, D.M., Kangro, H., Watkins, R.P. (1988) A prospective study of acute idiopathic neuropathy. II. Antecedent events. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 51, 613-618
- Winer, J.B., Briggs, D., Welsh, K., Hughes, R.A.C. (1988b) HLA antigens in the Guillain-Barré syndrome. *J.Neuroimmunol.* 18, 13-16
- Winer, J., Hughes, S., Cooper, J., Ben-Smith, A., Savage, C. (2002)  $\gamma\delta$  T cells infiltrating sensory nerve biopsies from patients with inflammatory neuropathy. *J.Neurol.* 249, 616-621
- Yuki, N., Sato, S., Itoh, T., Miyatake, T. (1991) HLA-B35 and acute axonal polyneuropathy following *Campylobacter* infection. *Neurology* 41, 1561-1563
- Yuki, N., Sato, S., Fujimoto, S., Yamada, S., Tsujino, Y., Kinoshita, A., Itoh, T. (1992) Serotype of *Campylobacter jejuni*, HLA, and the Guillain-Barre syndrome. *MuscleNerve* 15, 968-969
- Yuki, N., Taki, T., Inagaki, F., Kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., Handa, S., Miyatake, T. (1993) A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J.Exp.Med.* 178, 1771-1775



Yuki, N., Taki, T., Takahashi, M., Saito, K., Yoshino, H., Tai, T., Handa, S., Miyatake, T. (1994) Molecular mimicry between GQ1b ganglioside and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Fisher's syndrome. *Ann.Neurol.* 36, 791-793

Yuki, N., Tagawa, Y., Handa, S. (1996) Autoantibodies to peripheral nerve glycosphingolipids SPG, SLP, and SGPG in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J.Neuroimmunol.* 70, 1-6

Yuki, N., Takahashi, M., Tagawa, Y., Kashiwase, K., Tadokoro, K., Saito, K. (1997a) Association of *Campylobacter jejuni* serotype with antiganglioside antibody in Guillain-Barré syndrome and Fisher's syndrome. *Ann.Neurol.* 42, 28-33

Yuki, N. (1997b) Molecular mimicry between gangliosides and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barre syndrome and Miller Fisher syndrome. *J.Infect.Dis.* 176 Suppl 2, S150-S153

Yuki, N., Ho, T.W., Tagawa, Y., Koga M., Li, C.Y., Hirata, K., Griffin, J.W. (1999) Autoantibodies to GM1b and GalNAc-GD1a: relationship to *Campylobacter jejuni* infection and acute motor axonal neuropathy in China. *J.Neurol.Sci.* 164, 134-138

## Lebenslauf

Name: Schäfer  
Vorname: Sabine Maria  
Geburtstag: 01.04.75  
Geburtsort: Haßfurt  
Wohnort: Jörg-Hofmann-Str. 3; 97475 Zeil  
Kirchgasse 10; 97084 Würzburg

### Ausbildung:

1981 – 1985                      Grundschule Zeil

1985 – 1994                      E.T.A.-Hoffmann-Gymnasium Bamberg  
Abschluß: allgemeine Hochschulreife Juni 1994

Juli 1994 – Oktober 1994      Praktikum Brauerei Göller Zeil

1994 – 1999                      Studium der Lebensmittelchemie an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Vorexamen am 29. April 1997  
Abschluß: 1. Staatsexamen am 10. Juni 1999

1999 – 2002                      Doktorarbeit an der Neurologischen Klinik und dem Institut für  
Hygiene und Mikrobiologie der Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg

Februar 2002 – Juli 2002      Praktikum am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und  
Lebensmittelsicherheit Erlangen  
Abschluß: 2. Staatsexamen

Würzburg, Dezember 2002

Sabine Schäfer

## Publikationsliste

### Poster:

**Sabine Schäfer**, Edeltraud Lüneberg, Helge Karch, Matthias Frosch, Klaus V. Toyka und Stefan Jung. „Modulation of myelin-induced oral tolerance to experimental autoimmune neuritis by *Campylobacter jejuni*-derived LPS“ 11<sup>th</sup> International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, Freiburg, 1. – 5. September 2001

**Sabine Schäfer**, Uwe Enders, Edeltraud Lüneberg, Helge Karch, Matthias Frosch, Klaus V. Toyka und Stefan Jung. „Characterization of *Campylobacter jejuni*-specific human T cell lines with respect to their putative contribution to the pathogenesis of the Guillain-Barré syndrome“ 11<sup>th</sup> International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, Freiburg, 1. – 5. September 2001

**Sabine Schäfer**, Edeltraud Lüneberg, Helge Karch, Matthias Frosch, Klaus V. Toyka und Stefan Jung. „Die funktionelle Relevanz humoraler und zellulärer Immunreaktionen gegen *Campylobacter jejuni* in der Pathogenese von Immunneuropathien“ 106. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 29. April – 3. Mai 2000

### Vorträge:

**Sabine Schäfer**, Uwe Enders, Edeltraud Lüneberg, Helge Karch, Matthias Frosch, Klaus V. Toyka und Stefan Jung. „Characterization of *Campylobacter jejuni*-specific human T cell lines with respect to their putative contribution to the pathogenesis of the Guillain-Barré syndrome“ 11<sup>th</sup> International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, Freiburg, 1. – 5. September 2001

**Sabine Schäfer**, Edeltraud Lüneberg, Helge Karch, Matthias Frosch, Klaus V. Toyka und Stefan Jung. „Die Rolle von Immunreaktionen gegen *Campylobacter jejuni* in der Entstehung akuter Immunneuropathien“ 4. Fachgruppentagung der FG Gastrointestinale Infektionen in der DGHM, Würzburg, 29. September – 1. Oktober 2000

## Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Die funktionelle Relevanz humoraler und zellulärer Immunreaktionen gegen *Campylobacter jejuni* in der Pathogenese von Immunneuropathien“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 6. Dezember 2002

Sabine Schäfer