

Aus der Cecilie-Vogt-Klinik für Molekulare Neurologie
der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Ex-vivo Detektion und Quantifizierung autoreaktiver T-Zellen
bei
MS-Patienten und Kontrollen**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Sandra Rückert
aus München

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. F. Zipp

2.: Prof. Dr. med. R. Nitsch

3.: Prof. Dr. med. I. Bechmann

Datum der Promotion: 09.05.2008

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Die Erkrankung Multiple Sklerose	1
1.2. Das pathogenetische Konzept der Multiplen Sklerose	2
1.2.1. Die Rolle der T-Zellen	3
1.2.2. Myelinbestandteile als mögliche Antigene autoreaktiver T-Zellen	4
1.2.2.1. Myelin Basisches Protein (MBP)	5
1.2.2.2. Proteolipid Protein (PLP)	5
1.2.2.3. Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)	6
1.2.2.4. Myelin Assoziiertes Oligodendrozytisches Basisches Protein (MOBP)	7
1.3. Ex-vivo-Methoden zum Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen	7
1.4. T-Zell Apoptose	9
1.4.1. Die Rolle der Apoptose als möglicher Pathogenesefaktor der MS	10
1.5. Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material und Methoden	14
2.1. Material	14
2.2. Methoden	17
2.2.1. Multiple Sklerose Patienten und gesunde Kontrollen	17
2.2.2. Expanded Disability Status Scale (EDSS) und Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC)	18
2.2.3. Antigen	18
2.2.4. Zellkultur	20
2.2.4.1. Isolierung von mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation	20
2.2.4.2. Einfrieren und Auftauen von mononukleären Zellen	21
2.2.5. IL-7 modifizierter primärer Proliferationsassay	21
2.2.6. 4-Farb-Durchflusszytometrie	23
2.2.7. Limiting-Dilution Assay	24
2.2.8. DNA-Fragmentationsassay	25
2.2.9. Statistik	26
3. Ergebnisse	27

3.1. T-Zellreaktivität auf Myelinbestandteile bei MS-Patienten und Kontrollen (Querschnittsuntersuchung)	27
3.1.1. Proliferative Reaktivität auf Myelinantigen bei MS-Patienten und Kontrollen im IL-7 modifizierten Proliferationsassay	28
3.1.2. Reaktivität auf Myelinepitope in bezug auf die Klinik einzelner MS-Patienten	30
3.1.3. Nachweis und Quantifizierung Myelin-spezifischer T-Zellen mittels 4-Farb-Durchflusszytometrie	31
3.1.4. Zytokinproduktion autoreaktiver T-Zellen in bezug auf die Klinik einzelner MS-Patienten	33
3.2. Verlaufsuntersuchung der T-Zellreaktivität bei MS-Patienten und Kontrollen (Längsschnittuntersuchung)	34
3.2.1. Myelin-spezifische T-Zellreaktivität über einen viermonatigen Verlauf	35
3.2.2. Reaktivität auf MBP-Protein in bezug auf den klinischen Verlauf einzelner MS-Patienten	38
3.3. Korrelation des Multiple Sclerosis Functional Composite Score (MSFC) mit der Klinik einzelner MS-Patienten	38
3.4. Verlaufsuntersuchung des Aktivierungs-induzierten Zelltodes (AICD) bei MS-Patienten und Kontrollen	39
3.4.1. Der DNA-Fragmentationsindex in bezug auf die Klinik einzelner MS-Patienten	40
4. Diskussion	41
4.1. Methoden zur Quantifizierung autoreaktiver T-Zellen	41
4.2. Myelinantigen – Bedeutung für die Pathogenese der MS	43
4.3. „Epitop Spreading“	44
4.4. Frequenz Myelin-spezifischer T-Zellen	45
4.5. T-Zellreaktivität als Biomarker	46
4.6. Apoptoseresistenz als Pathomechanismus der MS	48
5. Zusammenfassung	51
6. Literaturverzeichnis	53
7. Anhang	66

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Kriterien für positiv gewertete Antigen-stimulierte Proben im IL-7 Proliferationsassay	23
Abbildung 2	Myelinantigen-spezifische Proliferation im IL-7 Proliferationsassay	29
Abbildung 3	Myelin-spezifische T-Zellreaktivität bei MS-Patienten und Kontrollen	30
Abbildung 4	Durchflusszytometrische ex-vivo Detektion Myelin-spezifischer T-Zellen	32
Abbildung 5	Proinflammatorische Myelin-spezifische T-Zellen bei MS-Patienten und Kontrollen	32
Abbildung 6	MBP-Reaktivität über einen Verlauf von vier Monaten	36
Abbildung 7	Vergleich der T-Zellreaktivität über den Verlauf bei MS-Patienten und Kontrollen	37
Abbildung 8	Apoptoseindizes über einen Verlauf von vier Monaten	40
Tabelle 1	Peptidsequenz eingesetzter Myelinpeptide	19
Tabelle 2	Charakteristika der MS-Patienten mit Myelin-spezifischer Antwort in der Querschnittsuntersuchung	28
Tabelle 3	Prozentualer Vergleich Myelin-spezifischer T-Zellantworten bei MS-Patienten und Kontrollen	29
Tabelle 4	Charakteristika der MS-Patienten und Kontrollen der Verlaufsuntersuchung	35

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
ALPS	Autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom
APC	Antigen-präsentierende Zelle
CD	cluster of differentiation
DISC	Death Inducing Signalling Complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot assay
FADD	Fas Associated Death Domain Protein
HLA	Human Leukozyte Antigen
ICAM	intracellular adhesion molecule
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-7	Interleukin7
LFA	lymphocyte function-associated antigen
MBP	Myelin Basisches Protein
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MOBP	Myelin assoziierte Oligodendrozytischer Basisches Protein
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSFC	Multiple Sclerosis Functional Composite
PBMC	peripher blood mononuclear cells
PLP	Proteolipid Protein
PNS	peripheres Nervebsystem
PPMS	primär chronisch progrediente MS
RRMS	schubförmig rezidivierende MS
SPMS	sekundär chronisch progrediente MS
TCR	T-Zell Rezeptor
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinasen

TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1ligand
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TNF-related apoptosis-inducing ligand Receptor
TT	Tetanus-Toxoid
VLA	very late antigen
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Die Erkrankung Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose, MS, ist in Nordeuropa und Nordamerika die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems, die meist im frühen Erwachsenenalter einsetzt und eine sehr variable Prognose aufweist. 80% der Patienten zeigen einen schubförmig-rezidivierenden Verlauf (RRMS), wobei sich die Symptome über Tage entwickeln und sich dann selbständig oder unter Medikamenten zurückbilden. Der Beginn dieser Form liegt um das 20-30igste Lebensjahr und zeigt eine weibliche Dominanz von 2:1. Kommt es zwischen Schüben zu einer Progression spricht man von einer sekundär-chronisch-progredienten Multiplen Sklerose (SPMS). 70% der Patienten mit RRMS gehen in diese Form über. Zeigt sich ein progredienter Verlauf von Beginn der Krankheit an, liegt eine primär-chronisch-progrediente Form (PPMS) vor. Seltener kommt es zu akut/subakuten Sonderformen wie Devic-, Schilder-Sklerose, Baló- oder Marburg-Variante.

Die Prävalenz in Deutschland liegt bei ca. 150/100000 Einwohner und die jährliche Neuerkrankungsrate beträgt 3/100000 Einwohner. Die Prävalenz der MS nimmt zum Äquator hin ab und ist mit mehr als 30 Neuerkrankungen auf 100000 Personen in Nordeuropa, im Süden Australiens und im mittleren Teil von Nordamerika am höchsten (Weinshenker BG, 1996). Die Gründe für die Variabilität der Inzidenz und Prävalenz weltweit sind unklar. Es scheinen sowohl Umweltfaktoren, als auch genetische Einflüsse eine Rolle zu spielen. Hinweise auf die Beteiligung von Umweltfaktoren geben unter anderem die Assoziationen der MS mit bestimmten viralen Infekten (Kurtzke JF, 1994) sowie epidemiologische Studien, in denen gezeigt wurde, dass Individuen, die vor dem 15. Lebensjahr von Gebiete mit hoher Inzidenz in solche mit niedriger oder umgekehrt ziehen, das gleiche Erkrankungsrisiko haben wie die dort ansässige Bevölkerung (Dean G und Kurtzke JF, 1971). Von MS-Patienten adoptierte Kinder zeigen keine höhere Inzidenz im Gegensatz zum erhöhten Erkrankungsrisiko unter Blutsverwandten. (Sadovnick AD et al., 1993). Bestimmte (Human leukocyte antigen) HLA-Allele, in Abhängigkeit von der Frequenz in der Gesamtbevölkerung, erhöhen das Risiko für MS (Jersild C et al., 1973; Weinshenker BG et al., 1998).

Die im Zentralen Nervensystem (ZNS) auftretenden demyelinisierten Plaques sind als Korrelat der klinischen Symptomatik anzusehen. Die Klinik der MS ist sehr mannigfaltig. Sensibilitätsstörungen, Sehstörung, Schwäche in den Gliedmaßen, Gangunsicherheit werden

häufig als Erstsymptome der RRMS beschrieben. Für die Diagnose eines Schubes müssen die Symptome objektivierbar sein und mindestens 24 Stunden anhalten. Die Diagnose MS kann gestellt werden, wenn nach einem ersten Krankheitsschub der Liquor MS-typische Veränderungen (intrathekale IgG-Synthese) zeigt, sich zwei oder mehr charakteristische Läsionen im initialen MRT finden und im Verlaufs-MRT (\geq drei Monate nach Schubereignis) mehrere entzündliche Herde in definierter Lage vorhanden sind, wovon mindestens einer Gadolinium anreichert (McDonald WI et al., 2001).

Die akute Schubbehandlung der MS erfolgt mit einer Kortikoidstoßtherapie. Die Wirkung wird mit Suppression der Entzündungsreaktion, Verringerung des entzündlich bedingten Ödems und Restauration der Blut-Hirn-Schranke erklärt. Neben dieser Schubtherapie gehören immunmodulatorische bzw. immunsuppressive Substanzen wie Interferon-beta, Glatirameracetat und Azathioprin zur Basistherapie. Bei rascher Progression der Erkrankung werden als weitere Therapie Zytostatika wie Mitoxantron Cyclophosphamid oder Methotrexat eingesetzt (Multiple Sklerose-Therapie-Konsensus-Gruppe (MSTKG 2004).

1.2. Das pathogenetische Konzept

Entscheidende Impulse für das Verständnis einzelner pathophysiologischer Vorgänge lassen sich aus dem Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) ableiten. Sie lässt sich in verschiedenen Tierspezies aktiv, durch Injektion von Myelinprotein/-peptiden, oder durch den Transfer aktivierter Myelin-spezifischer T-Zellen passiv auslösen.

Ähnlich der EAE finden sich bei der MS perivaskulär, konfluierende, entzündliche Infiltrate im ZNS. Pathologisches Korrelat dieser chronischen Entzündung bildet der demyelinisierte, sklerotische Plaque (Charcot M, 1868). Die MS galt lange als eine Erkrankung des Myelins und somit der weißen Hirnsubstanz. Neuere Untersuchungen haben jedoch zeigen können, dass es auch zu einem Befall der grauen Substanz sowie zur Axonerstörung kommt (Ferguson B et al., 1997; Trapp BD et al., 1998). Symptome der Erkrankung sind auf Demyelinisierung, axonale und neuronale Verluste, welche zu einer Unterbrechung oder Verlangsamung der Erregungsleitung führen, und Ödembildung, im Rahmen des entzündlichen Prozesses, zurückzuführen. Das Ausmaß der axonalen Verluste korreliert mit den permanent klinischen Defiziten (De Stefano N et al., 1998). Histopathologische Untersuchungen aktiver demyelinisierter Läsionen der frühen MS zeigen eine Heterogenität auf, wobei beschriebene Subtypen bei ein und demselben Patienten homogen sind. Abhängig vom Myelinverlust, der Ausbildung von Plaques, der Art des Oligodendrozytenverlusts und der Immunglobulin- und

Komplementablagerung werden vier Subtypen unterschieden, die möglicherweise auf unterschiedliche pathogenetische Prozesse der MS hindeuten (Lucchinetti C et al., 2000).

1.2.1. Die Rolle der T-Zellen

Die entzündlichen Infiltrate enthalten T-Lymphozyten, in geringerer Anzahl B-Lymphozyten, Plasmazellen und speziell in akut demyelinisierenden Läsionen aktivierte Mikroglia und Makrophagen (Esiri MM, 1977; Traugott U et al., 1983; Brück W et al., 1995). Dies sowie das proinflammatorische Zytokinmuster dieser Läsionen (Navikas V und Link H, 1996), die Assoziation mit dem MHC-II-Komplex (Major histocompatibility class), die Möglichkeit der Induktion ähnlicher entzündlicher Läsionen in der EAE durch Myelin-spezifische CD4+ T-Zellen und das Ansprechen der schubförmig-rezidivierenden MS auf immunsuppressive und –modulatorische Therapie sprechen dafür, dass eine T-Helfer vermittelte Autoimmunreaktion für die Pathogenese der MS eine erhebliche Rolle zu spielen scheint.

Das derzeitige Erklärungsmodell geht davon aus, dass T-Zellen, spezifisch für ZNS-Bestandteile, in der Peripherie aktiviert werden und die Blut-Hirn Schranke passieren (Martin R et al., 2001). Man weiß heute, dass T-Zellen wesentlich kreuzreaktiver sind (Mason D, 1998) als ursprünglich angenommen, so dass die Aktivierung dieser Zellen durch Umweltantigene vorstellbar ist. Unterlegt wird dies durch die Tatsache, dass virale und bakterielle Peptide Myelin-spezifische humane T-Zell Klone aktivieren können (Wucherpfennig KW und Strominger JL, 1995; Boucher A et al., 2007). Aktivierte T-Zellen können, sofern sie nicht peripher durch Regulationsmechanismen eliminiert werden, unabhängig von der Antigenspezifität die intakte Blut-Hirn-Schranke überwinden. Wichtig für diesen Schritt ist die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Lymphozyten LFA-2, LFA-1, VLA-4 und das Pendant auf Endothelzellen, LFA-3, ICAM-1, VCAM-1 sowie die Produktion von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) durch aktivierte Lymphozyten (Engelhardt B et al., 2005). Natalizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der an die 4–Untereinheit von 41–Integrin (VLA–4) und 47–Integrin bindet, wurde in mehreren klinischen Studie an RRMS-Patienten erfolgreich getestet (Miller DH et al., 2003). Ins ZNS eingedrungene aktivierte T-Zellen, die nicht spezifisch für Myelinantigen sind, werden eliminiert, wohingegen T-Zellen, die ihr Antigen finden, akkumulieren können (Oksenberg JR et al., 1991; Babbe H et al., 2000). Bekommt die T-Zelle nach der Penetration ins ZNS dort erneut ihr Antigen, beispielsweise Myelin von ortsständigen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), Mikroglia oder aus dem Blut eingewanderte Monozyten, in Zusammenhang mit MHC-II und kostimulatorischen Molekülen präsentiert, wird eine lokale

Entzündungsreaktion hervorgerufen, die zu Demyelinisierung und Zerstörung neuronaler Strukturen führen kann.

Aktivierte T-Zellen und Makrophagen produzieren im Zuge dessen proinflammatorische Zytokine beispielsweise TNF- α und IFN- γ . IFN- γ wird von aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen, TNF- α von aktivierten Monozyten und Makrophagen, Mikroglia, T-Zellen und Mastzellen gebildet. Induktion von Oberflächenmoleküle auf benachbarten Lymphozyten oder MHC-Antigen auf APCs, Aktivierung von Makrophagen und Freisetzung von reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffradikale, aber auch Induktion von Apoptose sind einige der immunmodulatorischen Effekte dieser Zytokine. Diese bedingen das Einwandern weiterer Entzündungszellen und somit Verstärkung und Unterhaltung der Entzündungsreaktion. Sowohl IFN- γ als auch TNF- α können Apoptose in Oligodendrozyten induzieren (Louis JC et al., 1993). Die Verschlechterung des Krankheitsverlaufs bei MS-Patienten unter systemischer Administration von IFN- γ (Panitch HS et al., 1987) liefert weitere Hinweise, dass proinflammatorische Zytokine für die Pathogenese eine Bedeutung haben können.

1.2.2. Myelinbestandteile als mögliche Antigene autoreaktiver T-Zellen

Der bei diesem Krankheitsbild charakteristische Myelinverlust führt dazu in Myelinbestandteilen mögliche Autoantigene autoreaktiver T-Zellen zu sehen.

Es ist mittlerweile bekannt, dass Myelin-spezifische T-Zellen sowohl im T-Zell-Repertoire von MS-Patienten als auch im Blut von gesunden Kontrollen gefunden werden (Hohlfeld R und Wekerle H, 2004). Ob es sich bei dieser Population um ein im Rahmen der negativen Selektion im Thymus unzensiertes, also nicht tolerantes, oder um eine Restpopulation, die aufgrund einer geringen Avidität Toleranzmechanismen passieren konnte, handelt, bleibt offen. Wie es scheint, hat das bloße Vorhandensein dieser Zellen keine Konsequenz im Hinblick auf die Erkrankung der MS. Nichtsdestotrotz führen die in den MS Läsionen anzutreffenden T-Zellen und der vorhandene Myelinverlust dazu, in Myelin-spezifischen T-Zellen einen pathogenetischen Faktor der Erkrankung zu sehen. Es stellt sich so die zentrale Frage, ob es Unterschiede in den Vorläuferfrequenzen bei MS-Patienten und Gesunden gibt. Dieser Punkt wird kontrovers diskutiert. So gibt es Arbeiten, die eine erhöhte Frequenz Myelin-spezifischer T-Zellen in MS-Patienten nachweisen (Olsson T et al., 1992; Zhang J et al., 1994; Hong J et al., 2004) und andere, die das nicht nachvollziehen konnten (Van der Aa A et al. 2003). Unterschiede in der Methodik und die verschiedenen verwandten Myelinbestandteile als Stimulus der T-Zellen

machen es schwierig diese Arbeiten zu vergleichen. Wie aus dem nächsten Abschnitt zu entnehmen, gibt es immundominante Myelinbereiche, aber auch solche, die durch ihre Lokalisation als ein erster Angriffspunkt der Autoimmunreaktion dieser T-Zellen dienen könnten. Neben Unterschieden in der Vorläuferfrequenz könnten Myelin-spezifische T-Zellen bei MS-Patienten andere Aktivierungszustände aufweisen oder aber bestimmte Myelinbestandteile bevorzugt erkennen. Interessant ist ferner zu klären, ob T-Zellfrequenzen oder bestimmte Aktivierungszustände Myelin-spezifischer T-Zellen je nach Krankheitsverlauf und Krankheitsaktivität variieren.

1.2.2.1. Myelin Basisches Protein (MBP)

MBP macht 30% des Myelins des ZNS aus. Die Genexpression von MBP kann im menschlichen Thymus nachgewiesen werden (Pribyl TM et al., 1996). Die enzephalitogene Wirkung von MBP in der EAE konnte vielfach gezeigt werden. Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass bei unterschiedlichen Spezies die Enzephalitogenität an unterschiedliche immundominante Epitope des Gesamtproteins, welche durch Prozessierung durch APCs oder extrazellulären, proteolytischen Enzymen entstehen, gebunden ist. Die T-Zell-Antwort auf diese Regionen ist an die Präsentation über MHC-II gekoppelt. Wie im Tiermodell sind MBP-spezifische humane T-Zellen hinsichtlich Epitopspezifität untersucht worden. Grundsätzlich reagieren T-Zelllinien von MS-Patienten und Kontrollen auf ein breites Spektrum an MBP-Peptiden und weisen eine Heterogenität in der T-Zellrezeptor-Gen (TCR V β -Usage) Expression auf (Ota K et al., 1990; Wucherpfennig KW et al., 1994). Aus der Bandbreite der Epitope gelang es mittels unterschiedlicher Methoden immundominante Bereiche herauszuarbeiten. Ein solcher ist im Bereich MBP Aminosäure aa83-99 zu sehen (Martin R et al., 1990; Ota K et al., 1990; Wucherpfennig KW et al., 1994; Bielekova B et al., 2000).

1.2.2.2. Proteolipid Protein (PLP)

Proteolipid Protein macht mit über 50% den Hauptbestandteil des Myelins des ZNS aus. Es ist ein intrinsisches Membranprotein mit vielen hydrophoben Anteilen und kovalent gebundenen langkettigen Fettsäuren, welches im Myelin des peripheren Nervensystems nicht zu finden ist. Wie bei MBP kann man mit dem Protein und mit einzelnen immundominanten Peptiden in unterschiedlichen Spezies aktive und passive EAE auslösen. Ähnlich dem MBP reagieren PBMCs von Gesunden und Patienten auf PLP (Markovic-Plese S et al., 1995; Greer JM et al.,

1997; Trotter JL et al., 1998). Immundominante Epitope sind um aa30-49 und aa180-199, die aus PLP über APCs prozessiert werden können, zu finden (Pelfrey CM et al., 1993; Markovic-Plese S et al., 1995; Greer JM et al., 1997; Trotter JL et al., 1998). Diese Epitope haben moderate Bindungsaffinitäten zu HLA-DR2 Isotypen, DRB1*1501 und DRB5*0101 (Hillert J et al., 1994; Markovic-Plese S et al., 1995).

PLP existiert in zwei Isoformen, die durch alternatives mRNA Splicing entstehen. PLP ist die längere und DM20 die kürzere Isoform, welcher eine Schleife von 35 Aminosäuren fehlt (Nave KA et al., 1987). Diese Schleife umfasst den Bereich PLP aa139-151. Interessanterweise ist die Expression von PLP im Thymus von Mensch und Maus auf die Isoform DM20 restringiert (Anderson AC et al., 2000; Klein L et al. 2000). Bei der Reifung von T-Zellen kommt es zur Toleranzinduktion im Thymus. Diese Toleranzinduktion sollte demzufolge auf Epitope aus der DM20 Form beschränkt bleiben, so dass fehlende Toleranzinduktion auf Bereiche der PLP Schleife, PLP aa139-151, zur Pathogenese der MS beitragen könnte. Immunhistochemische Färbung in humanem Hirngewebe zeigen eine homogene Expression von PLP aa139-151 im Myelin, wohingegen in demyelinisierten Bereichen kein Nachweis gelingt. In aktiv demyelinisierten Läsionen lässt sich dieser Peptidbereich im Zytoplasma von Makrophagen nachweisen (Laman JD et al., 2001). In der PLP suszeptiblen SJL/J Maus fällt nach vorausgegangener Immunisierung mit PLP-Protein die Antwort auf überlappende PLP-Peptide aus diesem Bereich besonders stark aus (Klein L et al. 2000). Ferner führt die Induktion von aa139-151 über einen Ig-Chimera in trächtige SJL/J Mäuse bei den Neugeborenen zu einer verminderten Reagibilität und macht sie sogar resistent gegenüber der Induktion der EAE mit dem Peptid PLP aa139-151 (Anderson AC et al., 2000).

1.2.2.3. Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)

Dieses Protein macht mit 0,05-1% einen sehr kleinen Anteil des ZNS-Myelins aus. Durch seine Lage auf der Oberfläche von Oligodendrozyten und auf der äußeren Myelinscheide könnte es als ein erster Angriffspunkt einer Autoimmunreaktion dienen. Es ist ein später Marker für Oligodendrozytenreifung und seine Expression korreliert mit den letzten Myelinisierungsstadien. Die Expression von MOG im menschlichen Thymus kann nicht nachgewiesen werden, so dass dieses Protein nur im ZNS vorhanden ist und der Toleranzinduktion entgeht (Bruno R et al., 2002). Aktive Immunisierung in Ratten und Primaten mit einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne aa1-125 induziert sowohl eine demyelinisierende Autoantikörperantwort als auch eine enzephalitogene T-Zell Antwort, die zu einer Demyelinisierung führt (Genain CP et al., 1995). In

akuten MS-Läsionen und in der EAE bei Marmosets konnte festgestellt werden, dass die Dissoziation der Myelinmembran an das Vorhandensein spezifischer anti-MOG Antikörper gebunden ist (Genain CP et al., 1999). Reaktivität auf diesen Myelinbestandteil findet man in den MS- und den Kontrollgruppen. Unter Verwendung von rekombinantem MOG werden im Test mit überlappenden Peptiden drei Bereiche, aa1-22, aa34-56 und aa64-96, bevorzugt erkannt (Kerlero de Rosbo et al., 1997). Peptid aa63-87 ruft in Individuen mit dem mit MS assoziierten HLA-DR2(15) Allel die stärkste IFN- γ Sekretion hervor. Die Stimulation mit diesem Peptid zeigt signifikant mehr IFN- γ produzierende Zellen bei MS-Patienten, verglichen mit Kontrollen, die den gleichen genetischen Hintergrund aufweisen. Die Proliferationsantwort auf dieses Peptid läßt sich ferner mit anti-HLA-II Antikörper blockieren, was die MHC-II abhängige Stimulation auf diesen Bereich bestätigt (Wallström E et al., 1998). Verglichen mit Gesunden können bei MS-Patienten höhere anti-MOG-IgG-Spiegel festgestellt werden (Gärtner S et al., 2004).

1.2.2.4. Myelin Assoziiertes Oligodendrozytisches Basisches Protein (MOBP)

MOBP ist der dritthäufigste Myelinbestandteil. Es wird dort von Oligodendrozyten exprimiert. Lokalisiert ist das Protein an der Major dense line des Myelins und es scheint für die Aufrechterhaltung der Myelinstruktur eine Rolle zu spielen. Sowohl mit rekombinantem MOBP als auch mit einem Peptidpool, der die Region MOBP aa37-60 umfasst, läßt sich in der SJL/J Maus EAE induzieren. Das menschliche MOBP zeigt eine 97% Homologie mit dem aminoterminalen Teil des murinen MOBP. Mögliche Bindungsmotifs für MS-assoziierte HLA-DR Allele DRB5*0101 (DR2a), DRB1*0401 und ein Teilmotif (partial motif) für DRB1*1501 (DR2b) können nach Sequenzanalyse im Bereich aa21-39 (Holz A et al., 2000) und aa15-36 (Kerlero de Rosbo N et al., 2004) des humanen MOBP gefunden werden. Interessanterweise liegt diese Region, in dem für die SJL/J Maus enzephalitogenen Bereich. Im Proliferationstest mit überlappenden MOBP-Peptiden reagieren PBMCs von MS-Patienten und Kontrollen (Kaye JF et al., 2000).

1.3. Ex-vivo-Methoden zum Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen

Eine der ältesten und häufig angewandten Methoden zum Nachweis einer Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort ist die Messung der Methyl-³[H]-Thymidin Aufnahme nach Antigen-induzierter Proliferation. Nach mehrfacher Stimulation und nachfolgender Verdünnung der T-Zellkonzentration bis im Idealfall ein Zellklon übrig bleibt, kann man über Limiting-Dilution

Assays Vorläuferfrequenzen reagierender T-Zellen berechnen. Für die Detektion der in sehr niedriger Frequenz vorkommenden autoreaktiven T-Zellen bedarf es meist erheblicher in-vitro Manipulation wie mehrfache Restimulation und die Zugabe von Wachstumsfaktoren, was die Aussagekraft einschränken kann. Zudem proliferieren vor kurzem aktivierte Memory-Zellen kaum nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation. Unter Zugabe von Interleukin-7 (IL-7) kann die Sensitivität und Spezifität für Memory-Zellen erhöht werden, so dass bei diesem Proliferationstest Restimulationszyklen wegfallen und die Inkubationszeit auf sieben Tage beschränkt bleibt (Bielekova B et al., 1999).

IL-7 ist ein Protein der hämatopoetischen Familie. Produziert wird dieses Zytokin von retikulären Stromazellen des Knochenmarks, von kortikalen Epithelzellen im Thymus, ferner durch folliculär dendritische Zellen und Keratinozyten. Der Rezeptor besteht aus einer α -Kette, der eigentlichen Bindungsstelle für den Liganden und aus einer γ -Kette, die gemeinsamer Bestandteil der Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-9 und IL-15 ist. IL-7 spielt für die Entwicklung von B- und T-Zellen in der Maus und für T-Zellen beim Menschen eine wichtige Rolle. Die Wirkung bleibt nicht auf lymphatische Vorläuferzellen begrenzt. IL-7 induziert in humanen T-Zell-Klonen unterschiedlichen Phänotyps ($CD4+/CD8+/CD4-$, $CD8-$, $\alpha\beta/CD4-$, $CD8-$, $\gamma\delta$) signifikante Proliferationsantworten, die durch Co-Mitogene zwar verstärkt werden, aber für die Proliferation nicht von Nöten sind (Grabstein KH et al., 1990). Ferner konnte gezeigt werden, dass IL-7 den Untergang von Antigen-aktivierten Zellen und ruhenden T-Zellen in der Maus in-vitro verhindern kann, wobei dieser Vorgang nicht mit einer massiven Zellproliferation einhergeht, der anti-apoptotische Effekte überdecken könnte (Vella AT et al., 1997). IL-7 entfaltet in humanen T-Zellen seine anti-apoptotische Wirkung ohne Veränderung der CD-45 Oberflächenexpression (Hassan J und Reen DJ, 1998; Bielekova B et al., 1999). Es kann eine Hochregulation von anti-apoptotischen Proteinen, Bcl-2 und Bcl-xl, nachgewiesen werden (Amos CL et al., 1998). Diese Wirkmechanismen lassen vermuten, dass unter Einsatz von IL-7 die Antwort ruhender Memory T-Zellen auf spezifische Antigene verstärkt werden kann indem der Aktivierungs-induzierte Zelltod (AICD) dieser Population vermindert wird. Zusammenfassend lässt sich IL-7 als ein wachstumsförderndes und anti-apoptotisches Zytokin, das aktivierte T-Zellen expandiert, ohne den Phänotyp zu beeinflussen, charakterisieren.

Neben diesem IL-7 modifizierten Kurzzeitproliferationstest kommt die ex-vivo durchflusszytometrische Analyse Antigen-spezifischer T-Zellen mit noch kürzeren Inkubationszeiten aus. Über MHC-Tetramer Färbung (Altman JD et al. 1998) und Peptid-spezifischer intrazellulärer Zytokinfärbungen (Kern F et al., 1998; 2000) können $CD8+$ T-Zell Antworten detektiert werden.

1.4. T-Zell Apoptose

Nach einer Immunreaktion sind effektive Kontrollmechanismen nötig, um das Individuum vor einer überschießenden Immunantwort zu schützen und letztlich zur Homöostase zurückzukehren. Die Elimination von Lymphozyten nach Aktivierung erfolgt über apoptotische Mechanismen, dem AICD. Daneben ist die Apoptose ein wesentlicher Mechanismus bei der Induktion von zentraler und peripherer Toleranz und somit ein wichtiger Faktor zur Verhinderung von Autoimmunreaktion und Autoimmunkrankheit.

Apoptotische Zellen zeigen eine charakteristische Morphologie und biochemische Veränderungen. Unter Zuhilfenahme dieser Veränderungen lässt sich Apoptose experimentell oder mikroskopisch nachweisen. Die Zelle schrumpft, das Chromatin kondensiert und aggregiert in der Peripherie des Zellkerns. Das mitochondriale Membranpotential geht verloren. Endonukleasen spalten die DNA zwischen den Nukleosomen, so dass DNA-Fragmente mit einer Länge von 200 Basenpaaren oder ganzzahlige Vielfachen davon entstehen. Die Membranstabilität geht verloren. Es kommt zu Membranausstülpungen, zum Auftreten von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche und schließlich zur Abschnürung membranumschlossener Vesikel, sogenannter apoptotischer Körperchen, die phagozytiert werden (Wyllie AH et al., 1980). Im Gegensatz dazu beobachtet man bei der Nekrose Zellschwellung mit Platzen der Membran und Freisetzung des Zytosols und der Organellen und in dessen Folge inflammatorische Reaktion und Gewebeschädigung.

Es wird zwischen einem extrinsischen und einem intrinsischen Weg der Apoptoseinduktion unterschieden, wobei erst genannter über sogenannte Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche, der intrinsische über Mitochondrien vermittelt wird (Igney FH und Krammer PH, 2002). Bei beiden Wegen wird eine Vielzahl an Caspasen aktiviert, die Zellsubstrate spalten.

Der extrinsische Weg spielt eine entscheidende Rolle in der T-Zell Apoptose. Todesrezeptor und Ligand gehören zur Familie der Tumornekrosefaktor-(TNF) Superfamilie. Nach Bindung des Liganden an den jeweiligen Rezeptor wird intrazellulär über Adaptermolekül eine inaktive Vorstufe einer Caspase assoziiert, autokatalytisch gespalten und somit in ein aktives Enzym überführt. Die Initiatorcaspase, Caspase-8, kann direkt nachgeschaltete Caspasen aktivieren und somit eine Caspasenkaskade auslösen, im Rahmen derer Caspase-3 aktiviert wird, die zelluläre Substrate spaltet. Zum anderen kann sie die Freisetzung von Cytochrom-c aus Mitochondrien bewirken und so indirekt nachfolgende Caspasen aktivieren. Offensichtlich entscheidet die Menge an aktivierter Caspase-8 darüber, welcher Weg eingeschlagen wird. (Scaffidi C et al., 1998; Krammer PH, 2000). Die Regulation der Apoptose findet auf mehreren Ebenen statt.

Beispielsweise kann FLIP (FLICE inhibitory protein) die Rekrutierung von Caspase-8 und deren Aktivierung verhindern (Irmeler M et al., 1997). Ein anderes Beispiel ist die Familie der Bcl-2 Proteine, welche sowohl antiapoptotische Moleküle wie Bcl-2 und Bcl-xL und Apoptose verstärkende, Bid, Bax, Bak, PUMA, Noxa, beinhaltet (Adams JM und Cory S, 1998). Letztendlich scheint das Verhältnis an apoptotischen und antiapoptotischen Substanzen darüber zu entscheiden, ob eine Zelle in den programmierten Zelltod eintritt oder nicht (Yang E und Korsmeyer SJ, 1996).

Mit CD95 (APO-1/Fas) ist 1989 erstmalig ein Zelloberflächenrezeptor beschrieben worden, der in der Lage ist Apoptose zu induzieren (Trauth BC et al., 1989; Yonehara S et al., 1989). Die Apoptoseinduktion über das CD95-System ist am besten verstanden und spielt eine entscheidende Rolle bei dem Aktivierungs-induzierten Zelltod von Lymphozyten (Alderson MR et al., 1995; Brunner T et al., 1995; Dhein J et al., 1995). Das ubiquitär vorkommende CD95 existiert als Transmembranform und als durch alternatives Splicen entstehende lösliche Form. Unter physiologischen Bedingungen wird Apoptose über den begrenzt vorkommenden Liganden CD95L (APO-1L, FasL) getriggert. Wie der Rezeptor existiert CD95L als Transmembranprotein und in löslicher Form. Mit TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), welches sich durch seine Homologie in der Proteinsequenz zu CD95L auszeichnet, wurde ein weiterer Ligand beschrieben, der nach Trimerisierung des jeweiligen Rezeptors in suszeptiblen Zellen über Aktivierung eine Caspasekaskade zur DNA-Fragmentation führt (Wiley SR et al., 1995).

1.4.1. Die Rolle der Apoptose als möglicher Pathogenesefaktor der MS

Mutationen im CD95-System können zu Dysregulation des Immunsystems mit Lymphadenopathie und Autoimmunerkrankung führen. Eine Punktmutation im CD95-Gen der Maus (lpr-(lymphoproliferation) Mutation) induziert eine stark verminderte Expression von CD95 mit Akkumulation anormaler T-Zellen. Die Symptome sind ähnlich denen des systemischen Lupus erythematodes. Eine ähnliche Klinik zeigen Mäuse mit Punktmutation des CD95 Liganden-Gen (gld-(generalized lymphoproliferative disease) Mutation), welche eine Bindung des CD95 Liganden an den Rezeptor verhindert (Nagata S, 1998). Beim Menschen sind ähnliche Dysfunktionen des CD95 (Typ 1a ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome)) und des CD95L (Typ 1b ALPS) beschrieben worden. Kinder mit ALPS oder Canale-Smith-Syndrome weisen Lymphadenopathie, Akkumulation von nicht malignen T-Zellen und Autoimmunphänomenen wie hämolytische Anämie, Thrombozytopenie auf (Rieux Laucat F et al., 1995; Drappa J et al., 1996).

Die Rolle der Apoptose bei der MS ist als ambivalent zu betrachten. Eine erhöhte Apoptoserate der T-Zellen in der spontan einsetzenden klinischen Erholungsphase der akuten EAE legt nahe, dass die Apoptose einen wesentlichen Beitrag zur Remission der Erkrankung leistet (Schmied M et al., 1993). Versuche im Tiermodell zeigen, dass eine gesteigerte Induktion von T-Zell Apoptose als Therapie dienen kann (Critchfield JM et al., 1994). Transferiert man T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen in gld-Mäuse, entwickeln diese einen prolongierten klinischen Verlauf, was auf eine verminderte T-Zell-Elimination durch CD95-vermittelte Apoptose zurückgeführt werden kann (Sabelko-Downes DK et al., 1999). Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass die intraperitoneale Injektion von löslichen neutralisierendem Trail-Rezeptor 2 zu einer Verschlimmerung einer MOG-induzierten EAE bei Mäusen führt (Hilliard B et al., 2001). Auf der anderen Seite scheinen Mitglieder der TNF-Familie bei der Schadensinduktion im ZNS beteiligt zu sein. So konnte eine direkte Oligodendrozytenschädigung durch TNF (Akassoglou G et al., 1998) und ein massiver Zelltod von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten durch TRAIL nachgewiesen werden (Nitsch R et al., 2000; Aktas O et al., 2005). In MS-Läsionen konnte eine verstärkte Expression von CD95-Ligand verglichen mit einer Kontrollgruppe (Dowing P et al., 1996) sowie eine Hochregulation von CD95 auf Oligodendrozyten nachgewiesen werden (D'Souza SD et al., 1996).

Neben der möglichen Schadensinduktion durch Apoptose liegen Hinweise einer gestörten apoptotischen T-Zell-Elimination als mögliche pathogenetische Ursache der Multiplen Sklerose vor. In-vitro Studien weisen eine verminderte apoptotische Deletion von Myelin-spezifischen T-Zellen bei MS-Patienten nach (Macchi B et al., 1999). Eine signifikante Zunahme der MBP-spezifischen T-Zell Frequenz in MS-Patienten verglichen mit Kontrollen nur in Anwesenheit eines die Apoptose blockierenden Antikörpers, zeigt, dass eine bestimmte Population, obwohl empfindliche für CD95-vermittelte Apoptose, in-vivo nicht deletiert wird (Zang YC et al., 1999). Die Erhöhung von antiapoptotisch wirkendem löslichen CD95 im Serum von MS-Patienten (Zipp F et al., 1998a) sowie die erhöhte Expression von dem Überlebensfaktor Bcl-X(L) in Patienten, (Waiczies S et al., 2002) unterstützen weiterhin die Hypothese, dass eine gestörte periphere T-Zell Elimination der MS zu Grunde liegen könnte. Es bleibt ferner zu klären, ob im Verlauf eines Schubes Veränderungen der Apoptoserate nachzuweisen sind.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Im Zuge der Multiplen Sklerose kommt es zur Zerstörung von Myelin, so dass diese Proteine als mögliche Autoantigene gehandelt werden. Eine wesentliche Rolle bei dieser Autoimmunreaktion scheinen Myelin-spezifische T-Zellen innezuhaben. Da diese Zellen auch im T-Zell-Repertoire von Gesunden gefunden werden können, bleibt die Frage nach Frequenzunterschieden bzw. unterschiedlichen Aktivitätszuständen dieser Zellen bei MS-Patienten. Weiterhin liegen Hinweise auf mögliche Dysregulationen im Bereich des Aktivierungs-induzierten Zelltodes dieser T-Zellen bei der MS vor. Interessant ist ferner zu klären, ob Frequenzen und Reaktionsmuster auf bestimmte Myelinbestandteile mit klinischen Verläufen und Krankheitsaktivität korrelieren.

Die Fragen, die sich im Rahmen dieser Arbeit ergaben, waren:

1. Gelingt der Nachweis und die Quantifizierung Myelin-spezifischer T-Zellen bei MS-Patienten und bei Gesunden mit Methoden, die mit wenig in-vitro Manipulation auskommen und somit eine ex-vivo Detektion ermöglichen. Wenn ja, liegen Unterschiede in der Frequenz bzw. im Reaktionsmuster auf Myelinbestandteile bei Patienten und Gesunden vor.
2. Lässt sich die T-Zellreaktivität auf Myelin und die Apoptoserate bei der Elimination aktivierter T-Zellen mit klinischen Verläufen korrelieren, um so mögliche Biomarker zu etablieren.

Um der ersten Fragen nachzugehen, wurden zwei Methoden, einerseits ein IL-7 modifizierter Proliferationsassay und andererseits eine 4-Farb-Durchflusszytometrische Messung intrazellulärer Zytokine eingesetzt. Beide wiesen den Vorteil auf, dass kurze Stimulationszeiten und nur ein Stimulationszeitpunkt anfiel, so dass wenig in-vitro manipuliert werden musste. Untersucht wurde die Reagibilität auf bestimmte Myelinbestandteile von PBMCs, die aus MS-Patienten und Gesunden isoliert wurden. Es wurde ein breites Spektrum an Myelinbestandteilen zur Stimulation eingesetzt. Entscheidend für die Auswahl der Myelinantigene waren unter anderem die Lokalisation im Myelinbereich, die Bedeutung für die EAE, die Immundominanz bestimmter Epitope, die Assoziation mit HLA-DR 2 Allelen, sowie die Abwesenheit bestimmter Bereiche im Thymus und somit möglicherweise fehlende Toleranzinduktion auf diese Bereiche. Neben der ex-vivo Detektion Myelin-spezifischer T-Zellen bei Patienten und Gesunden und deren

Frequenzbestimmung wurde die Reaktionen auf diese Myelinepitope mit MS-Verläufen und bestehender Krankheitsaktivität verglichen.

Um die T-Zellreaktivität und die Apoptoserate mit klinischen Verläufen korrelieren zu können wurde über vier Monate bei sechs MS-Patienten und sechs Kontrollen alle zwei Wochen Blut abgenommen und die PBMCs isoliert. Anschließend wurde die T-Zellreaktivität auf MBP-Gesamtprotein und die Apoptoserate untersucht. Zur Untersuchung der T-Zellreaktivität wurde der IL-7 modifizierte Proliferationsassay eingesetzt. Zur Messung des AICD wurde ein Protokoll mit repetitiven T-Zellrezeptorstimulationen verwandt und über ein DNA-Fragmentationsassay erfolgte die Messung des Apoptoseindex. Die ermittelte T-Zellreaktivität und die Apoptoserate wurde mit der Klinik der einzelnen Patienten korreliert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Zellkultur

Medien:

AB Medium:

RPMI ergänzt mit 10mM HEPES Puffer, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 10µg/ml Ciprofloxacin und 5% gepooltes humanes AB Serum (aus dem Blut AB positiver Spender, Institut für Transfusionsmedizin, Charite, Berlin).

FBS Medium:

RPMI ergänzt mit 10mM HEPES Puffer, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 10% Hitze inaktiviertes FBS Serum.

Waschmedium:

RPMI ergänzt mit 10mM HEPES Puffer, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 5% Hitze inaktiviertes FBS Serum.

Einfriermedium:

RPMI ergänzt mit 10mM HEPES Puffer, 2mM L-Glutamin, 20% Hitze inaktiviertes FBS Serum und frisch hinzugefügtes eiskaltes 10% DMSO.

Auftaumedium:

RPMI ergänzt mit 10mM HEPES Puffer, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 10% Hitze inaktiviertes FBS Serum.

Alle Medien wurden steril filtriert und bei 2-8 °C aufbewahrt.

Dichtegradient

LymphoprepTM

Abgedunkelt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Zellviabilität

0,4% Trypan Blau in 0,81% NaCl und 0,06% KPO₄ .

Bei Raumtemperatur aufbewahrt.

IL-2

Rekombinantes humanes Interleukin 2.

Kurzfristig bei 2-8 °C, sonst aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt.

IL-7

Rekombinantes humanes Interleukin 7

Bei -20 °C aufbewahrt.

Proliferationstest

Methyl-³[H] Thymidin:

	Spezifische Aktivität 185GBq/mmol, 5,0Ci/mmol; 777MBq/mg, 21mCi/mg
	Bei 2-8 °C aufbewahrt.
Antigen	Myelin Basisches Protein (MBP): Aus humaner Hirnsubstanz isoliert (Eylar EH et al., 1974), zur Verfügung gestellt von der Abteilung für Zell- und Neurobiologie des Instituts für Anatomie, Charite, Berlin. Myelin Peptide (siehe Methoden): Synthetisiert am Institut für Infektionskrankheiten und Immunologie, der Fakultät für Veterinärmedizin der Universität von Utrecht, Niederlande. Tetanus Toxoid (TT), Impfkonzentrat Alle Antigene bei -20 °C aufbewahrt.

4-Farb-Durchflusszytometrie

Antikörper	Oberflächenantigen: APC-konjugierter Maus Anti-Human CD3 (IgG1), PerCP-konjugierter Maus Anti-Human CD4 (IgG1), PE- konjugierter Maus Anti-Human CD69 (IgG1). Intrazelluläre Färbung: FITC- konjugierter Maus Anti-Human IFN γ (IgG2b), FITC konjugierter Maus Anti-Human TNF α (IgG1), Isotyp-Kontrollen. Antikörper wurden eingesetzt und bei 2-8 °C aufbewahrt.
Puffer	FACS-Puffer: PBS, 0,5% BSA und 0,1% Natrium-Azid
Reagenzien	Brefeldin A aufgenommen in DMSO (eingestellt auf 5mg/ml) Alliquotiert bei -20 °C aufbewahrt. FACS TM Permeabilisationslösung EDTA Bei 2-8 °C aufbewahrt
Antigen	siehe oben

Nicoletti-Assay (DNA-Fragmentationsassay)

Stimulus	PHA Lektin aus <i>Phaseolus vulgaris</i>
----------	--

Nicoletti-Lösung Propidiumiodid (1mg/ml) 1:20 mit Nicoletti-Puffer verdünnt
Puffer Nicoletti-Puffer:
Aqua dest, 0,1% Na-Citrat und 0,1% Triton X-100
Alle Reagenzien bei 2-8 °C aufbewahrt.

Chemikalien

Methyl- ³ [H] Thymidin	Amersham, Braunschweig, Deutschland
Antikörper (FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Aqua dest.	Braun, Melsungen, Deutschland
Brefeldin A	Sigma, Steinheim, Deutschland
BSA	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ciprofloxacin	Bayer, Leverkusen, Deutschland
DMSO (99,9%)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Dulbecco`s PBS	Sigma, Steinheim, Deutschland
EDTA	Sigma, Steinheim, Deutschland
FACS™ Permeabilisationslösung	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FBS Serum	Gibco Invitrogen Corp., Paisley, Schottland, UK
HEPES- Puffer	Gibco Invitrogen Corp., Paisley, Schottland, UK
IL-2	Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ,USA
IL-7	Peprotech INC, Rocky Hill, NJ, USA
KPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Gibco Invitrogen Corp., Paisley, Schottland, UK
Lymphoprep™	Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen
Natrium-Azid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Citrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,81 NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PHA	Sigma, Steinheim, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma, Steinheim, Deutschland
RPMI1640	Gibco Invitrogen Corp., Paisley, Schottland, UK
Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tetanus Toxoid	Chiron Behring, Marburg, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Steinheim, Deutschland

Trypan Blau (0,4%) Sigma Cell Culture, Irvine, UK

Geräte

Steriles Einwegmaterial	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Megafuge 1.0R-Heraeus	Kendro Lab. Products, Hanau, Deutschland
Megafuge 1.0-Heraeus	Kendro Lab. Products, Hanau, Deutschland
Inkubator Heraeus	Kendro Lab. Products, Hanau, Deutschland
sterile Werkbank Heraeus	Kendro Lab. Products, Hanau, Deutschland
HERASafe HS15,	Kendro Lab. Products, Hanau, Deutschland
Microbeta β -plate Counter	Wallac ADL, Freiburg, Deutschland
FACSCalibur™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CELLQuest™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
SPSS 10.0 Software für Windows	SPSS, Chicago, IL, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Multiple Sklerose Patienten und gesunde Kontrollen

Für die Querschnittsuntersuchung der T-Zellreaktivität gegenüber Myelinantigen wurde 37 MS-Patienten periphervenöses Blut (20-30ml) entnommen. Für die Kontrollgruppe wurden 24 gesunde Personen, 12 Männer und 12 Frauen, getestet.

Im Verlauf wurden sechs Patienten und sechs gesunde Kontrollen untersucht, wobei alle zwei Wochen, über einen 4-monatigen Zeitraum, Blutproben gesammelt wurden. Zu jedem Entnahmezeitpunkt wurde von demselben Kliniker die klinischen Scores, Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke JF, 1983) und Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) (Cutter GR et al., 1999) bestimmt.

Die HLA-Typisierung wurde freundlicherweise am Institut für Transfusionsmedizin mittels Allel-spezifischer PCR und SSP Analyse vorgenommen.

Die aus heparinisiertem Blut isolierten PBMCs wurden entweder sofort getestet oder in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.2. Expanded Disability Status Scale (EDSS) und Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC)

Der EDSS wird als Maß für neurologische Auffälligkeiten und Behinderung durch die MS angewandt. Die Ordinalskala des Scores reicht von null, normal, bis zehn, Tod durch MS und ist in 18 Halbpunkte unterteilt. Die Bestimmung bis zu dem Wert acht basiert auf neurologischen Untersuchungen. Hierbei werden acht funktionelle Systeme, das des Sehens, der Hirnstammfunktion, pyramidales-, sensibles-, cerebrales und cerebelläres System sowie die Fähigkeit zu Laufen und „Anderes“ untersucht. Von acht bis neuneinhalb wird zur Beurteilung im wesentlichen die Fähigkeit des Patienten sich selbständig zu versorgen herangezogen.

Aus dem Problem der Standardisierung, der mangelnden Reliabilität des EDSS heraus und vor allem wegen der Überbewertung der Gehfähigkeit wurde ein neuer Score, der „Multiple Sclerosis Functional Composite“ (MSFC), ins Leben gerufen. Der MSFC setzt sich aus drei Testeinheiten zusammen. Er enthält quantitative Tests zur Arm- und Handfunktion, zur Beurteilung kognitiver Fähigkeiten und zur Evaluierung von Bein- und Gehfunktion. Mit dem „Nine hole peg Test“ wird die Zeit bestimmt, die der Patient braucht, um neun Bausteine in ein Brett mit neun Vertiefungen zu stecken und wieder zu entfernen. Dabei wird die dominante Hand getrennt von der nicht dominanten gemessen. Im „Timed walk Test“ wird die Zeit in Sekunden gemessen, die der Patient für eine Gehstrecke von acht Metern braucht. Die kognitiven Fähigkeiten werden über den „Paced auditory serial addition Test = PASAT-3 min“ Test bestimmt. Während drei Minuten müssen Zahlen, welche per Tonband vorgespielt werden, zur vorgenannten Zahl addiert werden. Die Anzahl der korrekt berechneten Zahlen dient hier als Maßangabe. Die für einen Patienten ermittelten Teilergebnisse werden zu den Werten einer Grundgesamtheit in Bezug gebracht, wobei der Z-score nun angibt, wieviel Standardabweichungen der Patient im Gesamtergebnis über oder unter der Grundgesamtheit liegt. Je positiver die Z-scores sind desto weniger sind die Probanden beeinträchtigt. Dies steht im Gegensatz zum EDSS, bei dem der Grad der Behinderung mit steigendem Wert zunimmt.

2.2.3. Antigen

Humanes Myelin Basisches Protein (MBP) wurde aus weißer Substanz menschlichen Gehirns nach Eylar isoliert (Eylar EH et al., 1971). MBP-, PLP-, MOG- und MOBP- Peptide wurden am Institut für Infektionskrankheiten und Immunologie der Fakultät für Veterinärmedizin der Universität von Utrecht synthetisiert. Die Peptide wurden gereinigt und charakterisiert mit HPLC

(>70% Reinheit) und Massenspektrometrie. Um die immundominante Region von MBP, aa83-99 (Ota K et al., 1990), zu umspannen, wurden 15-mer Peptide, die sich um jeweils zehn Aminosäuren überlappten, gewählt und als MBP_{IE} (immundominantes Epitop von MBP) bezeichnet. Die immundominante Region von Proteolipid Protein, PLP aa184-209 (Diehl HJ et al., 1986), hier als PLP_{IE} bezeichnet, wurde durch 15-mer Peptide ebenfalls um zehn Aminosäuren überlappend präsentiert. Die PLP-Region, aa120-154, die fast ausschließlich im Gehirn exprimiert wird (PLP_{Br1-3}) (Klein L et al., 2000), ebenso wie die immundominante Region von Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein, MOG aa63-87 (Wallström E et al., 1998), wurde mit 15-mer Peptiden, jeweils versetzt um fünf Aminosäuren, umspannt. Bei PLP_{Br} wurden jeweils drei Peptide zu Pools, PLP_{Br1-3}, zusammengefasst. PLP aa148-162 wurde wegen Toxizität ausgeschlossen. Die Region von Myelin Assoziiertes Oligodendrozytisches Basisches Protein, MOBP aa21-39 (Holz A et al., 2000), als MOBP_{IE} benannt, wurde durch 15-mer Peptide, überlappend in elf Aminosäuren, umgriffen. Die Sequenzen sind in Tabelle 1 dargestellt. Es wurden entweder zwei oder drei Peptide zu einem Peptidpool zusammengefasst.

Peptide	Aminosäure	Sequenz
MBP_{IE}*	80 - 94	GRTQDENPVVHFFKN
	85 - 99	ENPVVHFFKNIVTPR
	90 - 104	HFFKNIVTPRTPPPS
PLP_{IE}	184 - 198	QSIAPPSKTSASIGS
	189 - 203	PSKTSASIGSLCADA
PLP_{Br1}⁺	108 - 122	ICGKGLSATVTGGQK
	113 - 127	LSATVTGGQKGRGSR
	118 - 132	TGGQKGRGSRGQHQA
PLP_{Br2}	123 - 137	GRGSRGQHQAHLER
	128 - 142	GQHQAHLERVCTCL
	133 - 147	HSLERVCTCLGKWLK
PLP_{Br3}	138 - 152	VCTCLGKWLGHDPDKF
	143 - 157	GKWLGHDPDKFVGITY
	148 - 162	HPDKFVGITYALTVV
MOG_{IE}	63 - 77	PEYRGRTELLKDAIG
	73 - 87	KDAIGEGKVTLRIRN
	83 - 97	LRIRNVRFSDDEGGFT
MOBP_{IE}	21 - 35	HFSIHCCPPFTFLNS
	25 - 39	HCCPPFTFLNSKKEI

Tabelle 1.: Sequenz überlappender 15-mer synthetischer Peptide unterschiedlicher Myelinbestandteile, die als Antigen verwandt wurden. * IE = Bereich umfasst Epitope, die als immundominant in MS-Patienten beschrieben werden. + Br = Bereich umfasst eine Sequenz des PLP Molekül, welche im menschlichen Gehirn, aber nicht im Thymus, exprimiert wird.

2.2.4. Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, steriles Einwegmaterial verwandt und die Medien steril filtriert. Die Zellkulturen oder Assays wurden bei 37 °C in einer 5% CO₂ Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.4.1. Isolierung von mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Mononukleäre Zellen (PBMCs) von Patienten und Kontrollen wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierbei werden unterschiedliche Blutzellen entsprechend ihrer Dichte separiert. So sinken Erythrozyten und Granulozyten sowie tote Zellen (hohe Dichte) nach unten, während die mononukleären Zellen, bedingt durch ihre niedrigere Dichte, nach dem Zentrifugationsschritt über dieser Schicht zu liegen kommen.

Das Vollblut wurde durch periphere Venenpunktion entnommen. Jeweils 30ml heparinisiertes Blut wurde mit PBS auf 50ml verdünnt und je 25ml davon vorsichtig über 15ml LymphoprepTM, welches Erythrozyten agglutiniert, geschichtet. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt bei 700g, 40min Dauer, ohne Bremse und bei Raumtemperatur, konnte der weiße Lymphozytenring über dem Erythrozyten- und Granulozytensediment mit einer Pasteurpipette abgenommen und überführt werden. Nach erneuter Zentrifugation (500g, 15 min Dauer, mit Bremse, bei Raumtemperatur) wurden die Zellen zweimal, einmal mit PBS und danach mit Waschmedium, gewaschen. Hierfür wurden das Sediment und die darin enthaltenen PBMCs zunächst mit 30ml PBS resuspendiert, abzentrifugiert (250g, 10min, bei RT), dekantiert und erneut in 10ml Waschmedium resuspendiert.

An diesen Schritt wurde die Zählung und der Viabilitätsstest mit Trypanblau gekoppelt. Hierbei macht man sich die Eigenschaft von Trypanblau zunutze, einem Farbstoff, der intakte Zellmembranen nicht penetrieren kann. So sind vitale Zellen von einem schimmernden Ring umgeben, können somit für das Auge besser sichtbar gemacht und gezählt werden, während in tote Zellen Trypanblau eindringen kann und diese als blauer Farbfleck zur Darstellung kommen. Jeweils 10µl der oben beschriebenen Zellsuspension wurden mit 10µl Trypanblau verdünnt (1:2 Verdünnung), in eine Neubauerzählkammer überführt und vier Gruppenquadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl berechnete sich aus: Zellzahl/Anzahl der ausgezählten Quadrate (4) * Verdünnungsfaktor (2) * Gesamtvolumen in ml (10ml) * Kammerfaktor (10000). Die in Klammern angegebenen Werte entsprachen unseren Gegebenheiten.

Nach dem sich anschließenden letzten Zentrifugationsschritt (250g, 10min, bei RT) wurden die PBMCs in Einfriermedium aufgenommen und eingefroren oder mit Kulturmedium resuspendiert und sofort weiterverwandt.

2.2.4.2. Einfrieren und Auftauen von mononukleären Zellen

Die folgenden Schritte wurden alle auf Eis ausgeführt. Je 10Mio PBMCs wurden in 0,5ml Einfriermedium aufgenommen, 0,5ml 20%DMSO-Lösung hinzupipettiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieser Schritt sollte sehr schnell geschehen, da DMSO auf Zellen toxisch wirkt. Die Zellen wurden stufenweise heruntergekühlt, kurze Zeit bei -20°C , dann bei -80°C , um am nächsten Tag in den Flüssigstickstofftank überführt zu werden.

Die PBMCs in Kryotubes wurden dem Stickstofftank entnommen und in handwarmem Wasser aufgetaut und unter vorsichtigem Pipettieren in Auftaumedium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (250g, 10 min, bei RT) wurden die Zellen in 10ml Waschmedium resuspendiert und gezählt. Im Anschluß konnten sie in das entsprechende Medium in der benötigten Konzentration überführt werden. Um die Zellen als Antigen präsentierende Zellen zu verwenden wurden sie mit 30Gy bestrahlt.

2.2.5. IL-7 modifizierter primärer Proliferationsassay

Für den IL-7 modifizierten primären Proliferationsassay wurde das von Bielekova et al. (Bielekova B et al., 1999) beschriebene Protokoll verwandt.

Die Proliferation der T-Zellen wurde mit Hilfe des Methyl- $^3\text{[H]}$ -Thymidintests gemessen. Sich teilende Zellen bauen diese radioaktiv-markierte Base in die DNA-Struktur ein und über die Menge der eingebauten Radioaktivität lässt sich das Ausmaß der Proliferation nachweisen. Das besondere an dieser Methode ist, dass die Proliferation auf ein Antigen ohne Restimulationszyklen bestimmt wird und so Änderung des Phänotyps bzw. in-vitro Manipulationen unwahrscheinlicher werden. Hierbei wird IL-7, ein Wachstum förderndes und antiapoptotisches Agens eingesetzt, mittels dessen Hilfe eine Myelin-spezifische T-Zelleantwort nach nur 7-tägiger Inkubation detektierbar wird.

Nach der Isolierung der mononukleären Zellen aus heparinisiertem Blut wurden die PBMCs in der Konzentration 1 Million/ml in T-Zell Kulturmedium (AB-Medium) aufgenommen und 1×10^5 Zellen je well in 96-well Mikrotiter-Rundbodenplatten ausgesät. Das Kulturmedium wurde mit

IL-7 in einer Endkonzentration von 10ng/ml angereichert. Für die Querschnittsuntersuchung wurden zehn wells je Antigen angelegt. Als Negativkontrolle diente die gleiche Anzahl wells mit IL-7 angereichertem Medium ohne Antigen. MBP-Gesamtprotein wurde in einer Endkonzentration von 25µg/ml, jedes Peptide in einer Konzentration von 10µg/ml verwandt. Bei den Myelinpeptiden wurden je drei überlappende Peptide in ein well gegeben. Die Zellen wurden für sieben Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Während der letzten 16 Stunden wurden die Zellen mit Methyl-³[H]-Thymidin in einer Dosis von 1µCi/well gepulst. Überschüssiges Thymidin wurde nach diesem Zeitraum abgewaschen, die Zellen in einem Harvester auf Filterpapier geerntet und diese mit Siliziumplatten verschmolzen. Die Radioaktivität wird als counts per minute (cpm) über einen Scintillation Counter in einem Microbeta β-Platten Counter gemessen. Vergleicht man nun Messungen mit und ohne Antigen lassen sich Stimationsindizes (SI = Wert des Thymidineinbaus [counts per minute = cpm] von Zellen mit Antigen / cpm von Zellen ohne Antigen) berechnen.

Die von Bielekova et al. geforderten stringenten Kriterien zur Definition eines positiven Ergebnisses wurden übernommen. Individuelle Antigen-stimulierte wells wurden als positiv gewertet, wenn beide der folgenden Kriterien erfüllt waren: (i) individueller Stimulationindex >2 (SI= Werte der Thymidininkorporation (counts per minute=cpm) eines wells mit Antigen/ Mittelwert des cpm der gesamten negativen Kontrollwells) und (ii) cpm-Wert eines wells mit Antigen größer als der Mittelwert cpm der negativen Kontrollwells plus 3 Standardabweichungen (siehe Abbildung 1). Die Höhe der T-Zell Antwort wurde über die Summe der SI aller positiver wells je Antigen ermittelt. Für die Längsschnittuntersuchung wurden nur eingefrorene PBMCs verwandt und die einzelnen Zeitpunkte je Proband wurden auf einmal angesetzt, um so möglichst gleiche Kulturbedingungen und Inkubationszeiten zu gewährleisten. Es wurde MBP (25µg/ml) und Tetanus Toxoid (TT) in einer Konzentration von 10µg/ml als alleinige Antigene eingesetzt, da die Stabilität der Antwort über einen Zeitraum interessierte und nicht in erster Linie die Reagibilität auf Antigen. Um Unterschiede besser herausarbeiten zu können wurden hier 30 wells je Bedingung angesetzt.

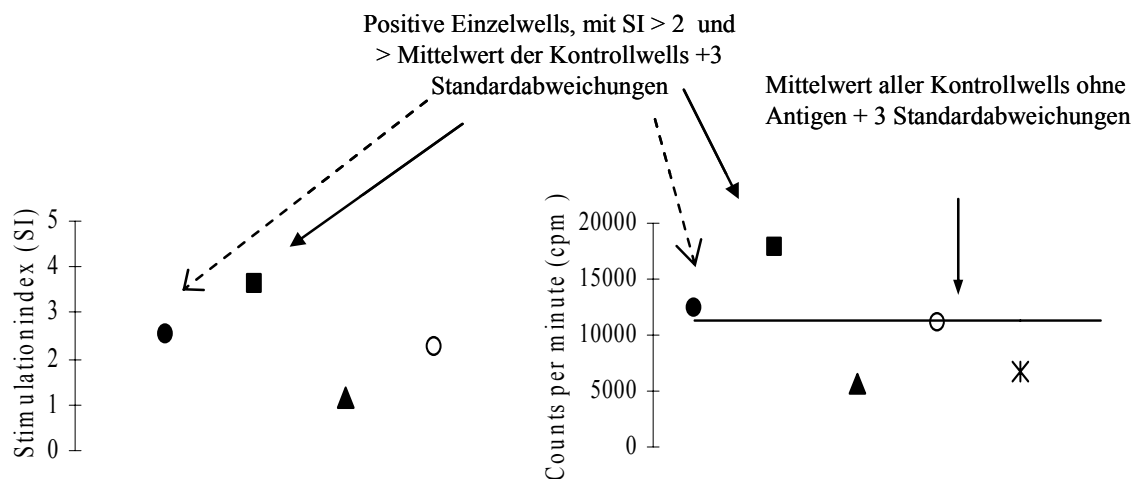


Abbildung 1.: Darstellung der zwei Kriterien für positiv gewertete Antigen-stimulierte Einzelwells im IL-7 modifizierten Proliferationsassay. Beide Bedingungen mussten zugleich erfüllt werden. SI = Werte der Thymidininkorporation (counts per minute=cpm) eines wells mit Antigen/ Mittelwert des cpm der gesamten negativen Kontrollwells); (counts per minute=cpm) = radioaktive Inkorporation, entspricht der Proliferation; Symbole wie ● = Antigen-stimulierte Einzelwells.

2.2.6. 4-Farb-Durchflusszytometrie

PMBCs wurden aus heparinisiertem Blut isoliert und in einer Konzentration von 10 Mio PBMCs/ml in 10% FCS-Medium aufgenommen. Je Ansatz wurden 200µl (ca. 2 Mio Zellen) in jedes Facsröhrchen pipettiert und für mindestens sechs Stunden in einer Schräglage von 5° in den Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ gestellt. Die Adhärenz an den Plastikröhrchen sollte zur Aktivierung der APCs beitragen. Nach dieser Zeit erfolgte die Antigenzugabe und zwar 25µg/ml MBP, 20µg/ml Myelinpeptide (je drei überlappender Peptide in ein Röhrchen) und Tetanus Toxoid 10µg/ml berechnet auf das Endvolumen 1ml, aufgenommen in 100µl 10% FCS. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden 10µg/ml Brefeldin A, aufgenommen in 500µl 10% FCS-Medium, hinzugefügt. In diesem Schritt wurden die Transportsysteme gehemmt, um so ein Austreten der nach Aktivierung entstehenden Zytokine zu verhindern, die später intrazellulär gefärbt wurden. Mit 3ml eiskaltem PBS wurde die Reaktion nach weiteren vier Stunden abgestoppt und zentrifugiert (250g, 8min, 4°C). Die anschließende Zugabe von 3ml 2mM EDTA-Lösung und 10 minütige Inkubation im Wasserbad (37°C) löste die adhärenen Zellen, die anschließend abzentrifugiert wurden (250g, 8min, 4°C). Im Anschluß wurden 1ml PBS zugegeben, vorsichtig 5 sec gevortext, nach Zugabe von 3ml Facspuffer erneut zentrifugiert (250g, 8min, 4°C), dekantiert und gut abgetupft. Mit 1ml Hyperperm®-Lösung und Inkubation

bei 10 Minuten Raumtemperatur wurden die PBMCs in einem Schritt fixiert und permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit einem Antikörperrgemisch von 38,5µl je Probe (INF- γ -FITC 10µl, TNF- α -FITC 10µl, CD69-PE 8µl, CD4-PerCP 10µl und CD3-APG 0,5µl) für 30 Minuten bei 4°C abgedunkelt, gefärbt. Mit 3ml FACS-Puffer und Zentrifugation (250g, 8min, 4°C) wurden die überschüssigen Antikörper abgewaschen und die Proben in einem FACSCalibur® Durchflusszytometer gemessen. Die Proben wurden als positiv gewertet, wenn eine distinkte CD69+ und IFN- γ /TNF- α produzierende Zellpopulation innerhalb der CD4+ reagierenden Zellen zu detektieren war, welche in der Kontrolle ohne Antigen nicht vorhanden war. Außerdem musste ein Minimum von 100 Counts/Ereignisse erreicht werden und der Stimulationsindex (SI= Prozentsatz der Ereignisse in Antigen-stimulierten Zellen / Prozentsatz der Ereignisse in nicht Antigen-stimulierten Zellen) > 1.5 sein. Für die Quantifizierung dieser Zellen wurden Prozentzahlen ermittelt indem Prozent der Ereignisse (CD4+/CD69+/INF- γ +/ TNF- α + aus CD3+ getateten Lymphozyten) der unstimulierten Proben von Antigen-stimulierten subtrahiert wurden.

2.2.7. Limiting-Dilution Assay

Es wurde ein modifiziertes Protokoll nach Pender (Pender MP et al., 2000) angewandt. Mit diesem Assay wird Proliferation auf ein Antigen im ³[H]-Thymidin Test nachgewiesen und näherungsweise Vorläuferfrequenzen Antigen-spezifischen Zellen berechnet. Im Idealfall liegen Punkte, deren Koordinaten durch die Zellkonzentrationen auf der x-Achse in Linearskala und der Fraktion nicht reagierender Kulturen in negativem Logarithmus auf der y-Achse festgelegt werden, auf einer geraden Linie mit negativer Steigung, die durch den Nullpunkt verläuft. Das ist dann der Fall, wenn klonale Proliferation nicht durch andere Faktoren wie Zell-Zell-Interaktion etc. beeinflusst wird und steigt mit der Anzahl der Versuchsansätze. Man sollte die Bedingungen der Versuche so gestalten, dass man möglichst an diese gerade Kurve herankommt. Es gibt aber Funktionen, die näherungsweise, unter Beachtung der Anzahl der Ansätze, Vorläuferfrequenzen berechnen, wie die Maximum-Likelihood-Methode (Dozmorov I et al, 2000).

Bei diesem Assay wurden aufgetaute und bestrahlte PBMCs als Antigen-präsentierende Zellen (APC) zu 50000/100µl Kulturmedium (AB-Medium) in 96-well Rundbodenplatten ausgesät. 24 Ansätze wurden für jede Zellkonzentration je Antigen bzw. für die Kontrollwells ohne Antigen ausplattiert. Diese wurden mit Antigen, Myelinpeptid 10µg/ml, MBP-Gesamtprotein 25µg/ml und TT 10µg/ml und ohne Antigen für die Negativkontrolle für mindestens 30 Minuten im

Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Frisch isolierte PBMCs aus heparinisiertem Blut wurden in vier verschiedenen Zellzahlkonzentrationen zu 100000, 50000, 10000 und 5000 Zellen in 100µl Kulturmedium zu den APCs hinzugefügt. Die Platten wurden für sechs Tage im Inkubator belassen. In den letzten 16h wurde ³[H]-Thymidin hinzugegeben und die Proliferation anhand der aufgenommenen Radioaktivität bestimmt.

Für die Auswahl der positiven Ergebnisse galten dieselben Kriterien wie für den IL-7 modifizierten Proliferationsassay. Die Anzahl der negativen wells für jedes Antigen jeder Zellkonzentration dient als Grundlage zur Bestimmung der Vorläuferfrequenz Antigen-spezifischer T-Zellen. Zur Bestimmung der Frequenz wurde ein Computerprogramm, basierend auf der Maximum-Likelihood-Methode zur optimalen Schätzung unbekannter Parameter von Dr C. Schmidt, Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australien, zur Verfügung gestellt.

2.2.8. DNA-Fragmentationsassay

Während des Aktivierungs-induzierten Zelltodes, AICD, kommt es in der Spätphase zur Fragmentation der DNA. Propidium Iodid kann zum Anfärben der DNA verwandt werden. Dieses Assay basiert auf der Beobachtung, dass fragmentierte DNA apoptotischer Zellen eine verminderte Anfärbbarkeit für Propidium Iodid als die DNA normaler diploider Zellen in der G₀/G₁ Phase aufweist. Dies stellt sich demnach als hypodiploide Zellpopulation im Histogramm der Durchflusszytometrie dar, so dass der Grad der DNA Fragmentation als ein Maß für späten apoptotischen Zelltod herangezogen werden kann (Nicoletti I et al., 1991).

Für die Bestimmung des AICD in der Längsschnittuntersuchung wurden nur eingefrorene PBMCs verwandt und die Ansätze parallel zu dem IL-7 Proliferationsassay der jeweiligen Probe angefertigt.

Die Zellen wurden aufgetaut und in einer Konzentration von 1 Mio/ml in 10% FCS-Medium aufgenommen. Jeweils 200µl (200000 Zellen) wurden in 96-well Platten pipettiert, wobei Dreifachwerte angefertigt wurden. Als apoptotischer Stimulus wurde PHA verwandt, welches in der Konzentration 1µg/ml als 1. Stimulus hinzugegeben wurde. Nach 24 h, am Tag 1, wurde 100µl Medium abgenommen, die wells gut resuspendiert, gesplittet und mit 150µl frischem 10% FCS-Medium aufgefüllt. Zusätzlich wurde in alle wells 20U/ml IL-2 hinzugefügt. Am Tag 6 wurde der 2. Stimulus gesetzt. Hierfür wurde erneut 100µl Medium gewechselt und auf jeweils die Hälfte der wells 10µg/ml PHA als 2. Stimulus gegeben, so dass man je Bedingung drei wells mit 1. Stimulus und 2. Stimulus PHA und drei wells nur mit 1. Stimulus hatte. 24 h später

wurden die angefertigten Platten abzentrifugiert (250g, 10 min, bei RT), dekantiert und erneut mit 200µl PBS gewaschen. Darauffolgend wurde das Pellet mit 150µl Nicoletti-Lösung resuspendiert. Nach einer 3-stündigen Inkubationszeit im Dunklen, bei 4°C konnte die Höhe des hypodiploiden Peaks im FACSCalibur® Durchflusszytometer gemessen werden und mit Hilfe von CELLQuest™ ausgewertet werden. Die Ergebnisse wurden als Prozentzahl der apoptotischen Population in bezug auf die Gesamt Ereignisse zum Ausdruck gebracht. Der DNA-Fragmentationsindex wurde aus dem Quotienten der Prozentzahl der Mittelwerte hypodiploider Ereignisse mit zwei PHA Stimuli durch die Prozentzahl der Mittelwerte mit nur dem 1. Stimulus berechnet.

2.2.9. Statistik

Für die Statistik wurde der nicht-parametrische Mann Whitney U-Test angewandt. Die Berechnungen wurden mit SPSS Software für Windows durchgeführt.

Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. T-Zellreaktivität auf Myelinbestandteile bei MS-Patienten und Kontrollen (Querschnittsuntersuchung)

Zur Untersuchung der Frage, ob Unterschiede zwischen dem Nachweis Myelin-spezifischer T-Zellen und deren Frequenz bei MS-Patienten und Gesunden bestehen, wurden Myelin-spezifische T-Zellen mittels IL-7 modifizierten Proliferationsassay und 4-Farb-Durchflusszytometrie ex-vivo detektiert. Weiterhin wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und T-Zellantwort vorlag.

In diese Querschnittsuntersuchung der T-Zellreaktivität gegenüber Myelinantigenen wurden 37 Frauen und Männer mit klinisch definierter Multipler Sklerose (Mc Donald WI et al., 2001) eingeschlossen. 29 dieser Patienten zeigten eine RRMS, die verbleibenden einen SPMS-Verlauf. Als Kontrollgruppe dienten 24 gesunde Personen. Im IL-7 modifizierten Proliferationstest wurden alle Personen getestet, in der 4-Farb-Durchflusszytometrischen Messung 33 der 37 Patienten und alle 24 Kontrollen. Je nach Menge der aus dem Blut eines Individuums, isolierten PBMCs wurde eine entsprechende Anzahl von Myelinpeptiden (siehe Tabelle 1) und MBP-Gesamtprotein an einer Person untersucht.

Da sich der IL-7 modifizierte Proliferationsassay nicht zur Bestimmung von T-Zellfrequenzen eignet, wurde als Maß der T-Zellreaktivität der kumulative Stimulationsindex (SI = Wert des Thymidineinbaus [counts per minute = cpm] von Zellen mit Antigen / Mittelwert des cpm der 10 negativen Kontrollwells) der positiv gewerteten wells eines Antigens verwandt. Über die durchflusszytometrische Messung konnten Frequenzen Myelin-spezifischer T-Zellen ermittelt werden.

Die Hauptcharakteristika der MS-Patienten, die in der Querschnittsanalyse Reaktivität auf Antigenstimulation im IL-7 modifizierten Proliferationsassay zeigten (MS1-MS17), sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Von den 17 Patienten hatten zum Zeitpunkt der jeweiligen Blutabnahme vier einen sekundär-chronisch progredienten Verlauf, der Rest einen schubförmig-rezidierenden. Die Dauer der Erkrankung reichte von null bis zu dreißig Jahren, die EDSS Werte lagen zwischen null und maximal sechs. Sieben Patienten hatten zum Zeitpunkt der Blutabnahme Krankheitsaktivität und nur eine Minderheit erhielt eine medikamentöse Therapie.

Subjekt	Alter (Jahre)	Geschlecht	Krankheitsverlauf ^{a)}	Dauer der Erkrankung (Jahre)	EDSS ^{b)}	2 oder mehr Schübe in den letzten 2 Jahren	Krankheitsaktivität	Medikation ^{c)}
IL-7 modifizierter Proliferationsassay								
MS1	30	w	RRMS	3	1.5	-	-	-
MS2	35	w	RRMS	6	2.5	-	-	-
MS3	40	w	RRMS	2	3.5	+	+	Interferon β / Steroide
MS4	28	m	RRMS	1	2.0	+	-	-
MS5	32	w	RRMS			*		
MS6	25	w	RRMS	2	0.0	+	+	-
MS7	57	w	SPMS	28	6.0	+	+	-
MS8	30	w	RRMS	3	4.0	+	+	Steroide
MS9	32	w	RRMS	8	4.0	+	+	Steroide
MS10	38	m	SPMS	2	3.5	+	+	-
MS11	39	w	SPMS	5	2.5	-	-	-
MS12	48	w	RRMS	30	0.0	-	-	-
MS13	45	m	RRMS	1	0.0	-	-	-
MS14	30	w	RRMS	2	3.5	+	-	-
MS15	52	m	SPMS	10	4.0	-	-	-
MS16	40	w	RRMS	8	1.0	-	-	-
MS17	35	w	RRMS	0	1.5	-	+	-

a) RRMS = schubförmig rezidivierende MS, SPMS = sekundär chronisch progrediente MS

b) EDSS = Expanded disability status scale

c) Zum Zeitpunkt der Blutentnahme

* nicht erhältlich

Tabelle 2.: Charakteristika der MS-Patienten, die Myelin-spezifische Antworten in der Querschnittsuntersuchung im IL-7 modifizierten Proliferationsassay zeigten. Die Daten wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme erhoben.

3.1.1. Proliferative Reaktivität auf Myelinantigenen bei MS-Patienten und Kontrollen im IL-7 modifizierten Proliferationsassay

Wie aus Abbildung 2 zu entnehmen ist, erfolgten Myelin-spezifische Antworten auf alle untersuchten Peptide und MBP-Gesamtprotein. In 17 aus 37 untersuchten MS-Patienten (45,9%) ließ sich eine Myelin-spezifische Antwort nachweisen. Aus der gesunden Kontrollgruppe zeigten 12 von 24 (50,0%) Reaktivität. Die Mehrzahl der Antworten wurde auf eine Stimulation mit MBP-Gesamtprotein beobachtet. Von den PBMCs, isoliert aus MS-Patienten, zeigten 21,6% Reaktivität. Höher fiel die Antwort in der Kontrollgruppe aus; hier fand sich bei 33,3% der Untersuchten ein Nachweis. Weiterhin konnten in beiden Gruppen häufig Reaktionen auf PLP_{Br2} (MS 22,2% und Kontrolle 26,3%) und MBP_{IE} (MS 16,7% und Kontrolle 13,6%) gesehen werden (Tabelle 3).

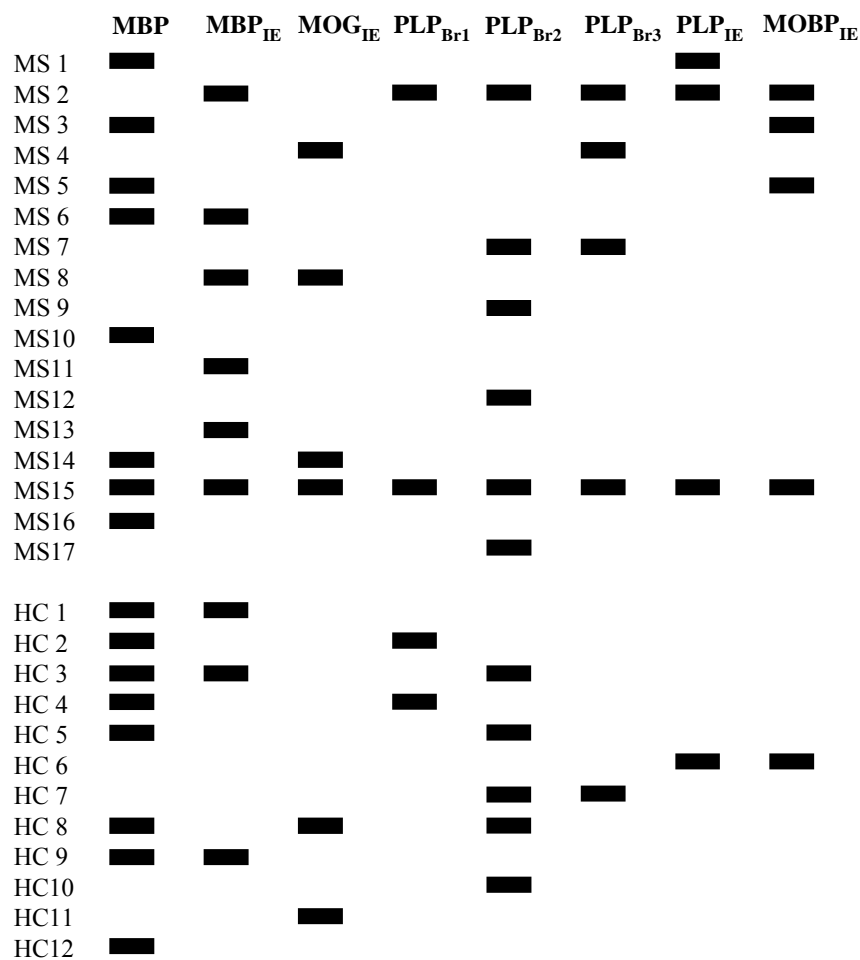


Abbildung 2.: Auflistung von Individuen mit T-Zellreaktivität gegen ein oder mehr Myelinpepitope gemessen mit dem IL-7 modifizierten Proliferationsassay. Schwarze Balken zeigen die Antwort auf das betreffende Antigen bei MS-Patienten (MS) und gesunden Kontrollen (HC).

Antigen	Gesamt		MBP		MBP _{IE}		MOG _{IE}		PLP _{Br1}		PLP _{Br2}		PLP _{Br3}		PLP _{IE}		MOBP _{IE}	
Subjekt	MS	HC	MS	HC	MS	HC	MS	HC	MS	HC	MS	HC	MS	HC	MS	HC	MS	HC
n/n _{all}	17/37	12/24	8/37	8/24	6/36	3/22	4/36	2/19	2/27	2/18	6/27	5/19	4/18	1/15	3/36	1/17	4/23	1/14
(%)	(46)	(50)	(22)	(33)	(17)	(14)	(11)	(11)	(7)	(11)	(22)	(26)	(22)	(7)	(8)	(6)	(17)	(7)

Tabelle 3.: Patienten (MS) und gesunde Kontrollen (HC), die auf Myelinreaktivität im IL-7 modifizierten Proliferationsassay getestet wurden. n_{all} steht für die Individuen, die gegen ein bestimmtes Antigen getestet wurden und n für die Anzahl derer, die Reaktivität zeigten.

Beide Gruppen zeigten Proliferation auf MOBP_{IE} , PLP_{IE} , bzw. $\text{PLP}_{\text{Br}3}$, wobei nur jeweils ein gesundes Individuum (MOBP_{IE} , PLP_{IE} , in HC 6 und $\text{PLP}_{\text{Br}3}$ in HC 7) reagierte. In mindestens drei MS-Patienten fand man jedoch Reaktivität auf eben diese Epitope.

Aus Abbildung 3 ist ersichtlich, dass sich im IL-7 modifizierten primären Proliferationsassay in der Gruppe der MS-Patienten auf MBP_{IE} , MOG_{IE} , $\text{PLP}_{\text{Br}1}$, $\text{PLP}_{\text{Br}2}$, PLP_{IE} und MOBP_{IE} eine höhere T-Zellreaktivität, ausgedrückt als kumulativer Stimulationsindex aller positiv gewerteter Einzelwells bestimmten ließ. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant.

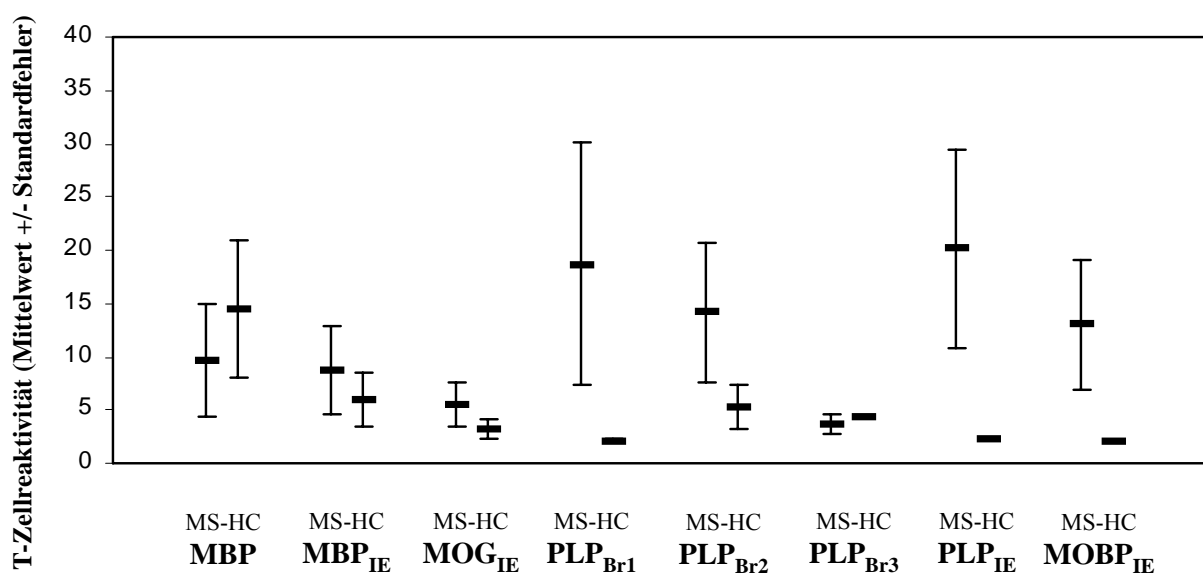


Abbildung 3.: Proliferationsantworten gegen unterschiedliche Myelinantigene zeigten keinen Unterschied zwischen MS-Patienten (MS) und Kontrollen (HC) in der Querschnittsuntersuchung. Die T-Zellreaktivität wurde mittels IL-7 Proliferationsassay bestimmt und als Maß der kumulative Stimulationsindex der „positiven“ wells (siehe Material und Methoden) verwandt. Es wurden Mittelwert des kumulativen Stimulationsindex +/- Standardfehler angegeben.

3.1.2. Reaktivität auf Myelinepitope in bezug auf die Klinik einzelner MS-Patienten

In Tabelle 2 sind klinische Angaben zu den Patienten, die Proliferation auf Myelinbestandteile zeigten, aufgelistet. Hinsichtlich der Krankheitsdauer ließ sich zwischen Patienten die mehrere Myelinbestandteile erkannten, wie MS2 und MS15 und solchen die nur auf ein Epitop reagierten, wie beispielsweise MS9 oder MS10 kein Unterschied festmachen. So war MS2 seit sechs Jahren erkrankt, MS15 seit zehn Jahren, bei MS9 war die MS vor acht, bei MS10 vor zwei Jahren

diagnostiziert worden. Obwohl MS2 und MS15 zahlreiche Antigene erkannten, zeigte keiner von beiden zum Zeitpunkt der Blutabnahme klinische Aktivität oder einen Schub. Beide hatten unterschiedliche Verlaufsformen der Krankheit, MS2 einen schubförmigen, MS15 hingegen einen chronisch-progredienten Verlauf. Patienten mit Krankheitsaktivität (MS 3,4,6,7,8,9,10) erkannten unterschiedliche Antigene. Zusammenfassend konnte kein Unterschied in der Erkennung von Myelinbestandteilen bezogen auf den Krankheitsverlauf, RRMS versus SPMS, auf Aktivität versus stabile Phase und auf die Behandlung mit immunmodulatorischer Therapie versus keiner Therapie gesehen werden.

3.1.3. Nachweis und Quantifizierung Myelin-spezifischer T-Zellen mittels

4-Farb-Durchflusszytometrie

Dass die *ex-vivo* Detektion aktivierter Zytokin-produzierender CD4⁺-T-Zellen nach Myelinstimulation gelang, zeigt Abbildung 4. Drei, nach den im Methodenteil beschriebenen stringenten Kriterien positiv gewertete Proben mit Prozentangaben, wurden nachfolgend abgebildet.

Die Gesamtzahl der Myelinantigene zusammengenommen zeigten drei Individuen positive Ergebnisse, im Sinne einer distinkten T-Zellpopulation, von insgesamt 33 getesteten Patienten mit MS (9,1%). Bei den gesunden Kontrollen reagierten zwei von 24 (8,3%). Wie aus Abbildung 5 zu entnehmen, reagierten die PBMCs von Patienten mit MS auf MBP-Protein (MS8) auf PLP_{Br2} (MS18) und von MS19 sogar auf Epitope unterschiedlicher Myelinbestandteile, MOG_{IE}, PLP_{IE} und MOBP_{IE}. In den zwei Kontrollen konnten Antworten auf MBP (HC8) und MOG_{IE} (HC9) nachgewiesen werden.

Auf MBP-Gesamtprotein (MS8, HC8) und MOG_{IE} (MS19; HC9) reagierten beide Gruppen. Antworten auf PLP_{Br2} (MS18), PLP_{IE} und MOBP_{IE} (MS19) wurden nur in MS-Patienten gesehen.

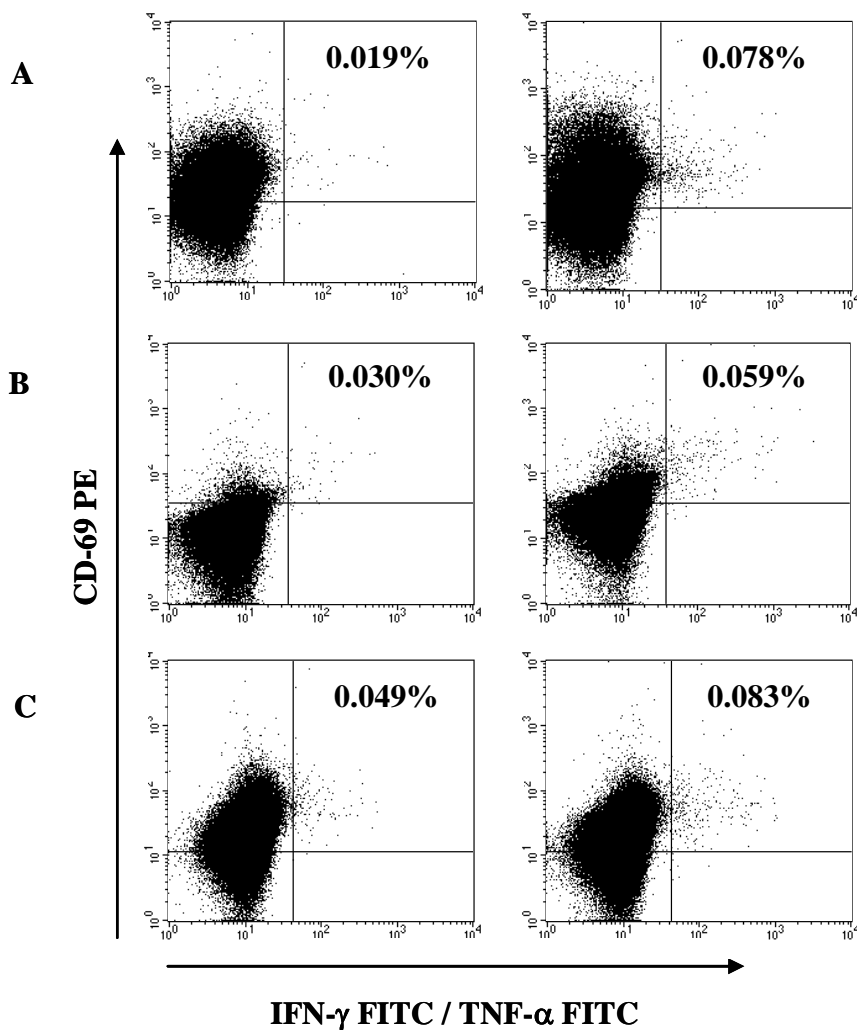


Abbildung 4.: Direkte ex-vivo Detektion von proinflammatorischen Myelin-reaktiven T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung. Frisch isolierte PBMCs wurden für sechs Stunden mit MBP Protein bzw. Myelinepitopen stimuliert. Darstellung von CD3+/CD4+ Zellen, mit einer distinkten INF- γ + / TNF- α produzierenden CD69+ Population nach Stimulation (rechte Säule) auf MBP Protein (A, C) und MOB_{IE} (B), welche in der unstimulierten Kontrolle (linke Säule) nicht gesehen wurden.

	MBP	MBP _{IE}	MOG _{IE}	PLP _{Br1}	PLP _{Br2}	PLP _{Br3}	PLP _{IE}	MOBP _{IE}
MS 8	■							
MS 18					■			
MS 19			■				■	■
HC 8	■							
HC 9			■					

Abbildung 5.: Auflistung von Individuen mit T-Zellreaktivität gegen ein oder mehr Myelinepitope, gemessen mit der 4-Farb-Durchflusszytometrie. Schwarze Balken zeigen die Antwort auf das betreffende Antigen bei MS-Patienten (MS) und gesunden Kontrollen (HC).

Es wurden Frequenzen dieser Myelin-spezifischen T-Zellen berechnet. Bei MS-Patienten lagen diese zwischen 0,027% und 0,037%. Die Prozentzahl bei den Kontrollen war 0,015% und 0,059%, jeweils bezogen auf die Gesamtzahl von 2 Millionen eingesetzter PBMCs. Die Mittelwerte aller positiven Antworten \pm Standardfehler in Patienten und Kontrollen beliefen sich auf 0,031% \pm 0,002% bzw. 0,037% \pm 0,029% . Von 10^6 PBMC wurden ungefähr 320, CD3+/CD4+ Zellen, durch eine Inkubation mit einem Myelinbestandteil aktiviert (CD 69+) und produzierten proinflammatorische Zytokine (INF- γ + / TNF- α +).

Um die mittels Durchflusszytometrie erhaltenen Frequenzen vergleichen zu können, wurde mit einer anderen etablierten Methode, einem vereinfachten Limiting-Dilution Assay (Pender MP et al., 2000), Vorläuferfrequenzen von Myelin-spezifischen T-Zellen bestimmt. Die berechneten Frequenzen, bezogen auf 10^6 PBMCs, isoliert aus einem gesunden Spender, lagen bei: MBP 3,36; MBP_{IE} 3,30; MOG_{IE} 2,10; PLP_{Br1} 1,78; PLP_{Br2} 0,19; PLP_{Br3} 2,33; PLP_{IE} 2,50 und MOBP_{IE} 2,19 Zellen. Um Antigen zu sparen, wurden die Myelinpeptide nur an einer Person getestet.

3.1.4. Zytokinproduktion autoreaktiver T-Zellen in bezug auf die Klinik einzelner MS-Patienten

MS8 ist der einzige MS-Patient bei dem parallel zur Reaktivität im IL-7 modifizierten Proliferationsassay eine Detektion Myelin-spezifischer T-Zellen im 4-Farb-Durchflusszytometer möglich war. Im Proliferationstest war Reaktivität auf MBP_{IE} und MOG_{IE} nachweisbar. Auf die Stimulation mit MBP-Gesamtprotein ließ sich hier ebenfalls eine CD3+/CD4+ INF- γ + / TNF- α produzierende Zellpopulation detektieren. Der Patient mit RRMS befand sich zum Zeitpunkt der Untersuchung im Schub. Die anderen beiden Patienten mit distingten Zellpopulationen hatten ebenfalls einen schubförmig-rezidivierenden Verlauf, wobei MS18 keine Krankheitsaktivität aufwies, MS19 im Schub getestet wurde. Bedingt durch die niedrige Anzahl an positiven Ergebnissen war es nicht möglich eine Korrelation zwischen Myelin-spezifischer Reaktivität und Klinik der MS-Patienten herzustellen.

3.2. Verlaufsuntersuchung der T-Zellreaktivität bei MS-Patienten und Kontrollen (Längsschnittuntersuchung)

Ziel der Querschnittsuntersuchung war es, zwei Methoden hinsichtlich der Detektion autoreaktiver T-Zellen und Quantifizierungsmöglichkeiten dieser Zellen bei MS-Patienten und Kontrollen zu untersuchen. Wie oben gezeigt, konnte in der Durchflusszytometrie bei der überwiegenden Zahl der Probanden keine Populationen Myelin-spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde nur der IL-7 modifizierte Proliferationsassay in der Längsschnittuntersuchung verwandt. Untersucht werden sollte die Stabilität der T-Zellantwort auf MBP-Gesamtprotein über einen viermonatigen Zeitraum an sechs MS-Patienten und sechs gesunden Kontrollen. Neben der Stabilität der Antwort, sollte die Reaktivität mit dem klinischen Verlauf der MS über diesen Zeitraum korreliert werden.

Alle Probanden hatten in Vorversuchen auf das Gesamtprotein MBP reagiert und waren nicht in der Querschnittsuntersuchung getestet worden. Tetanus-Toxoid wurde als Recallantigen eingesetzt. Insgesamt wurden 30 Wells je Bedingung und 30 Leerwerte ohne Antigen nur mit IL-7 Zugabe angesetzt. Für die Auswertung galten dieselben stringenten Kriterien wie für die Querschnittsuntersuchung. Der kumulative Stimulationsindex diente als Maß der T-Zell-Reaktivität.

Die Charakteristika der sechs MS-Patienten und der sechs gesunden Kontrolle sind Tabelle 4 zu entnehmen. Bei den MS-Patienten wurden fünf mit RRMS- und einer mit SPMS-Verlauf eingeschlossen. Die Krankheitsdauer variierte zwischen einem Monat (EB) bis zu vier Jahren (CA). Bei jeder Blutabnahme, welche im Abstand von zwei Wochen über einen viermonatigen Zeitraum erfolgte, wurde, soweit möglich, der klinische EDSS und MSFC Score bestimmt. Bei Patient CA konnten nur sechs Blutabnahmen gemacht werden, der MSFC wurde bei HK aus zeitlichen Gründen erst ab Termin drei und bei VS nicht zum Zeitpunkt eins bestimmt. Da der MSFC empfindlicher auf kleinere Veränderungen reagiert, wurde bei den Verlaufsdaten nur dieser angegeben. Zwei Patienten entwickelten Schübe während der Untersuchung (HK, EB). Bei Patient EB wurde eine Therapie mit Interferon beta-1a während der Längsschnittuntersuchung begonnen. Als Krankheitsaktivität wurde definiert, wenn ein Schub innerhalb drei Wochen um die Blutentnahme und/ oder eine EDSS Zunahme um mehr als einen Punkt innerhalb der letzten sechs Monate gesehen wurde.

Subjekt	Alter (Jahre)	Geschlecht	Krankheits- verlauf ^{a)}	Erst- diagnostik (Monate)	Schübe seit ED ^{b)}	EDSS ^{c)}	Medikation (Beginn:Monat/Jahr)	HLA-Haplotypen			
								DRB1		DRQ1	
Patienten mit MS											
VS	26	w	RRMS	9	2	1.0	Glatirameracetat (5/00)	11	12	03	
MM	40	w	RRMS	21	6	3.5	Interferon beta-1b (6/99)	15	11	03	06
HK	36	m	SPMS	39	seit 12 Monaten SPMS	4.0	Interferon beta-1b (7/97)	04	13	06	03
EB	35	w	RRMS	1	1	2.0	Interferon beta-1a (10/00)	03	15	02	06
CA	19	w	RRMS	45	2	0	-	15	16	05	06
BF	36	m	RRMS	11	4	2.0	Interferon beta-1a (2/00)	03	11	02	03
Gesunde Kontrollen											
wk	34	m						01	1601	0501	0502
zf	37	w						13	15	06	
sb	22	w						04	11	03	
dj	26	m						07	12	0301	02
wu	35	m						14	15	05	06
lj	28	m						03	14	05	02

Tabelle 4.: Merkmale der MS-Patienten und der gesunden Kontrollen der Längsschnittuntersuchung.

3.2.1. Myelin-spezifische T-Zellreaktivität über einen viermonatigen Verlauf

Reaktivität auf MBP-Gesamtprotein zeigten alle sechs MS-Patienten (siehe Abbildung 6A), wohingegen nur vier der gesunden Probanden (siehe Abbildung 6B) reagierten. Von den Kontrollen zeigten jd und wu zu keinem Zeitpunkt eine Antwort auf MBP. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, ließ sich bei den zehn Personen nicht zu jedem Zeitpunkt eine T-Zellreaktivität detektieren. So erhielt man bei den Patienten zu 27 Zeitpunkten, bei den Kontrollen zu 16 eine Myelin-spezifische T-Zellantwort. Auf TT reagierten alle Testpersonen zu fast allen Zeitpunkten und wie nicht anders zu erwarten, fielen die Stimulationsindizes höher aus.

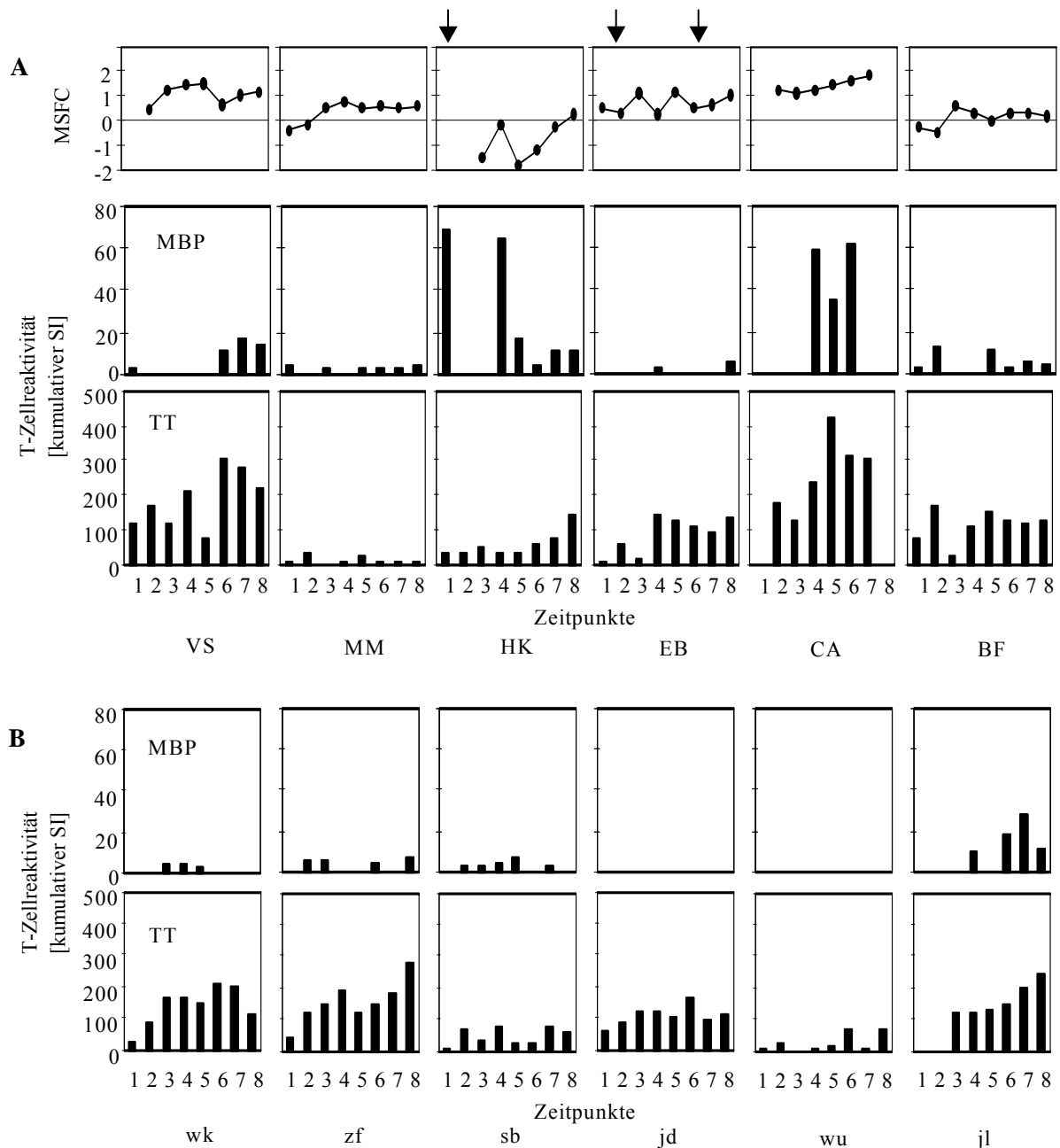


Abbildung 6.: Abbildung der T-Zellantwort auf MBP/TT parallel zu klinischen Parametern über einen viermonatigen Zeitraum. Alle zwei Wochen wurde Blut von sechs MS-Patienten (A) und sechs gesunden Kontrollen (B) entnommen. Klinische Aktivität der MS wurde mittels MSFC gemessen. Werte sind als z-scores (je niedriger der Wert, desto höher die Behinderung) wiedergegeben. Die schwarzen Pfeile zeigen den Zeitpunkt eines akuten MS Schubes (Patient HK und EB) während des Verlaufs an. T-Zellreaktivität auf MBP und TT wurde mittels IL-7 Proliferationsassay gemessen. T-Zellreaktivität auf das entsprechende Antigen ist durch den kumulativen Stimulationsindex „positiver“ wells ausgedrückt (siehe Material und Methoden). Schwarze Balken zeigen den kumulativen Stimulationsindex (SI) zum jeweiligen Zeitpunkt an.

Verglich man die Reaktivität über den gesamten Zeitraum (siehe Abbildung 7), in dem die Mittelwerte für T-Zellreaktivität auf MBP und auf TT von MS-Patienten und Gesunden gebildet und der Mann-Whitney rank Summentest für unverbundene Stichproben angewandt wurde, so stellte man fest, dass die Höhe der T-Zellreaktivität bei MS-Patienten höher, $MS=9,56$ Kontrolle= $2,54$, und statistisch signifikant ($p=0,02$) war, wohingegen die Reaktivität auf TT in etwa gleich war, $MS=112,45$ Kontrolle= $102,10$ $p=0,99$. Beim statistischen Vergleich der einzelnen Zeitpunkte zwischen Gesunden und Kontrollen konnte keine Signifikanz gezeigt werden.

Der Zahlenwert der gestrichelten Linie in Abbildung 7 ist der Mittelwert der Kontrollen plus zwei Standardabweichungen nach oben. Dieser Wert diente als Marke zur Beurteilung einzelner Antworten. Deutlich darüber lag die Reaktivität auf MBP bei Patient HK zum Zeitpunkt 1 und 4 sowie CA zum Zeitpunkt 4-6. Von den Kontrollen war ein Wert von jl zum Zeitpunkt 7 jenseits der Marke anzutreffen. Zeitgleich zeigten CA und jl auch hohe T-Zell Antworten auf TT, so dass hier von einer erhöhten Aktivität des Immunsystems beider ausgegangen werden konnte. Parallel zur hohen Antwort auf MBP ließen sich bei HK keine erhöhte Reaktivität auf Tetanus-Toxoid ermitteln.

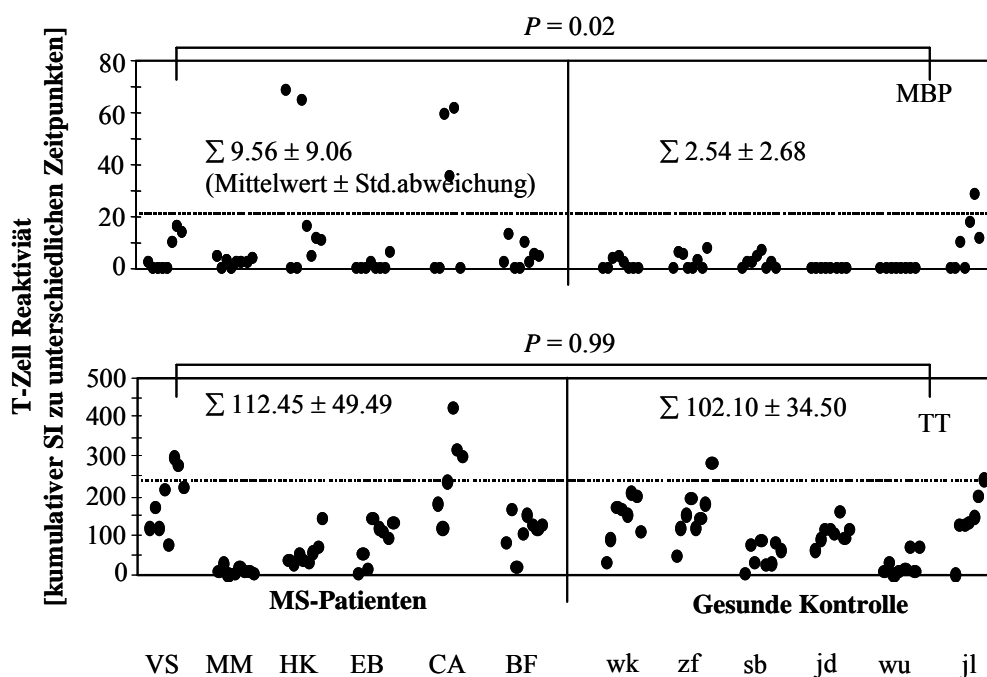


Abbildung 7.: Dargestellt ist die höhere Proliferationsantwort gegen MBP-Protein in MS-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen im Verlauf, welche auf TT nicht gesehen wurde. Alle zwei Wochen wurde Blut von sechs MS-Patienten (A) und sechs gesunden Kontrollen (B) entnommen. T-Zellreaktivität auf MBP und TT wurde mittels IL-7

Proliferationsassay gemessen. Schwarze Punkte zeigen den kumulativen Stimulationsindex (SI) „positiver“ wells zum jeweiligen Zeitpunkt an. Die Gesamtreaktivität in der Patienten- und Kontrollgruppe ausgedrückt durch den Mittelwert des kumulativen SI „positiver wells“ zu jedem Zeitpunkt und von jedem Individuum der jeweiligen Gruppe (Σ), wurde mittels Mann Whitney U-Test verglichen. Die gestrichelte Linie entspricht dem Mittelwert + zwei Standardabweichungen der T-Zellreaktivität gegenüber dem jeweiligen Antigen gemessen in der gesunden Kontrollgruppe.

3.2.2. Reaktivität auf MBP-Protein in bezug auf den klinischen Verlauf einzelner MS-Patienten

Die zwei Schubereignisse von EB korrelierten nicht mit einer Zunahme der Reaktivität auf MBP, wobei EB generell schwach reagierte.

Der Schub von HK zum Zeitpunkt 1 hingegen wurde von einer hohen Reaktivität begleitet. Für den erneuten Anstieg zum Zeitpunkt 4 gab es keinen Hinweis einer klinischen Verschlechterung. Ob das Aussetzen von Interferon- β , als Immunmodulator, zu diesem Zeitpunkt eine Rolle für die Zunahme der Reaktivität spielte, bleibt Spekulationen vorbehalten (Abbildung 6). Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Z-score bzw. der klinischen Progression/ Verbesserung und der T-Zell Reaktivität gegen MBP feststellen.

3.3. Korrelation des Multiple Sclerosis Functional Composite Score (MSFC) mit der Klinik einzelner MS-Patienten

Aus Abbildung 6 ist zu entnehmen, dass zwei Patienten, HK und EB, während der Verlaufsuntersuchung Schübe, HK zum Zeitpunkt 1, EB zwischen erster und zweiter Blutentnahme und erneut zum Zeitpunkt 6 entwickelten. Die anderen vier Patienten (VS, MM, CA, BF) zeigten einen stabilen Verlauf während der vier Monate. Bei Patientin EB wurde zum Zeitpunkt 4 mit einer Interferon- β Therapie begonnen, die anderen Patienten waren bereits zu Studienbeginn auf eine immunmodulatorische Therapie eingestellt.

Patientin CA mit einer klinisch sicheren, laborgestützten Diagnose einer RRMS von vor 45 Monaten und einem sehr milden Verlauf, mit nur einem weiteren Schub seit Diagnosestellung, zeigte einen Z-score der immer über eins (1,1-1,8) blieb und im Verlauf auch die höchsten Werte erreichte. Dem gegenüber war der EDSS mit konstant 0 über den Verlauf hinweg der niedrigste. Im Gegensatz dazu blieben die Z-scores von HK immer unter 0, sprich unter der Baseline der Grundgesamtheit. Dieser Patient, der nur zwei Jahre nach Erstdiagnose von einem schubförmig-remittierenden in einen progredienten Verlauf übertrat, hatte mit einem EDSS von vier auch den höchsten Grad an Behinderung des untersuchten Kollektivs. Vergleich man Patient BF und VS,

mit einer Erstdiagnose von 11 bzw. 9 Monaten, spiegelte sich der schwere Verlauf von BF, mit einer häufigen Schubfrequenz als auch mit Teilremission nach einem Schub deutlich im niedrigeren Z-score wieder. Leider wurden zum Zeitpunkt 1 und 2, während des Schubs von HK keine Daten erhoben. Für den erneuten Abfall des Z-scores zum Zeitpunkt 5 ließ sich kein klinisches Korrelat erheben. Bei Patientin EB fiel der Schub zwischen Zeitpunkt 1 und 2 mit einer Abnahme des Z-scores (0,3), bei EDSS von 2, zusammen. Zum nächsten Zeitpunkt war die Patientin in voller Remission mit einem Z-Score von 1,1 und einem EDSS von 1. Bedingt durch die kurze Abfolge zweier Schübe, Erstdiagnose zu Studienbeginn vor einem Monat, dann erneuter Schub, wurde die Patientin zum Zeitpunkt 4 auf Interferon beta-1a eingestellt und zum nächsten Abnahmetermin wurde der höchste Wert mit 1,2 und EDSS von 1 erreicht. Ein weiterer Schub, zum Zeitpunkt 6, ging mit einer Abnahme des Z-scores (0,5) und EDSS auf 3 einher, um dann während der Remission wieder anzusteigen/abzufallen. Konnte man in diesem Fall eine Korrelation zwischen Klinik und Z-score, bzw. EDSS sehen, zeigten einige Probanden z.B. VS zwischen 5. und 6. oder BF zwischen 2. und 3. Zeitpunkt keine Klinik parallel zu den Z-score Schwankungen.

3.4. Verlaufsuntersuchung des Aktivierungs-induzierten Zelltodes (AICD) bei MS-Patienten und Kontrollen

Um zu untersuchen, ob es Unterschiede bei der Elimination aktivierter T-Zellen zwischen MS-Patienten und Kontrollgruppe gab, wurde das Ausmaß des Aktivierungs-induzierten Zelltodes (AICD) über einen viermonatigen Zeitraum an den oben genannten 12 Personen im Verlauf gemessen. Mit einem zweimaligen PHA-Stimulus wurde der Aktivierungs-induzierte Zelltod eingeleitet und die DNA-Fragmentation mittels Nicoletti-Assay bestimmt. Es wurden 3-fach Werte angesetzt und jeweils der Mittelwert berechnet. Der apoptotische Index wurde aus dem Quotient PHA-PHA/PHA-LW gebildet. Wie bei dem Proliferationsassay wurde ein Marker, in diesem Fall Mittelwert des apoptotischen Index aller Werte der Kontrollgruppe minus zwei Standardabweichungen, gewählt. Minus zwei Standardabweichungen deshalb, weil ausgehend von einer verminderten Apoptose, als ein möglicher Pathogenesefaktor der MS, ein niedrigerer apoptotischen Index im Patientenkollektiv erwartet wurde.

Der Vergleich der Mittelwerte aller Zeitpunkte zusammengenommen von MS-Patienten (Mittelwert des apoptotischen Index 1,54) versus Kontrollgruppe, (Mittelwert des apoptotischen Index 1,83) zeigte eine statistisch signifikante niedrigere Apoptoserate bei den MS-Patienten

($p=0.002$). Aus Abbildung 8 lässt sich entnehmen, dass alle apoptotischen Indizes der Gesunden zu allen Zeitpunkten über der gewählten Markierungslinie lagen.

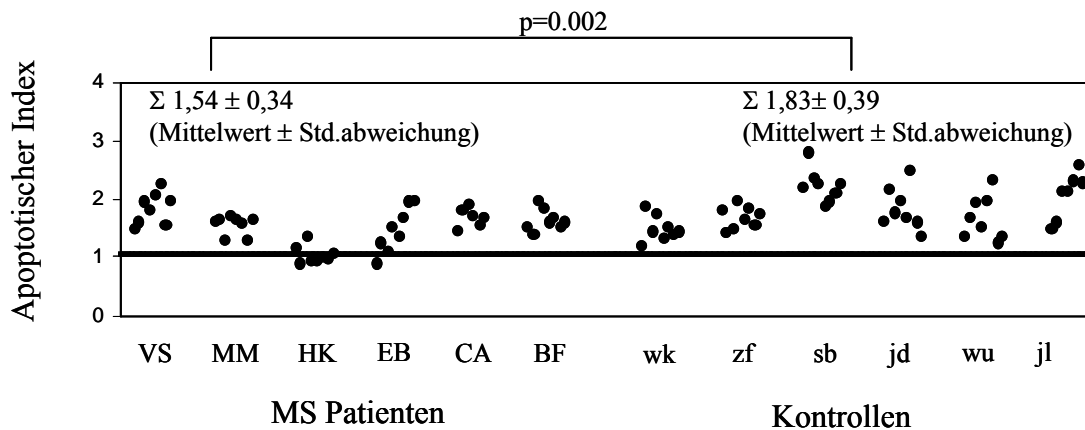


Abbildung 8.: Dargestellt ist der niedrigere apoptotische Index in MS-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen im Verlauf. Alle zwei Wochen wurde Blut von sechs MS-Patienten und sechs gesunden Kontrollen entnommen. Der apoptotische Index wurde mittels DNA-Fragmentationsassay gemessen. Der DNA-Fragmentationsindex wurde aus dem Quotienten der Prozentzahl der Mittelwerte hypodiploider Ereignisse mit zwei PHA Stimuli durch die Prozentzahl der Mittelwerte mit nur dem 1. Stimulus berechnet. Schwarze Punkte zeigen den apoptotischen Index zum jeweiligen Zeitpunkt an. Der Gesamtindex der Patienten- und der Kontrollgruppe, ausgedrückt durch den Mittelwert des DNA-Fragmentationsindex zu jedem Zeitpunkt und von jedem Individuum der jeweiligen Gruppe (Σ), wurde mittels Mann Whitney U-Test verglichen. Die durchgezogene Linie entspricht dem Mittelwert - 2 Standardabweichungen des DNA-Fragmentationsindex der gesunden Kontrollgruppe.

3.4.1. Der DNA-Fragmentationsindex in bezug auf die Klinik einzelner MS-Patienten

Aus Abbildung 6 ist zu entnehmen, dass zwei der MS-Patienten Schübe, HK zum Zeitpunkt eins und EB zwischen Zeitpunkt eins und zwei und zum 6. Zeitpunkt, entwickelten. Wie in Abbildung 8 dargestellt, waren diese Ereignisse nicht von sehr hohen oder sehr niedrigen Apoptoseraten begleitet. Patient HK hatte den niedrigsten apoptotischen Index aller und blieb zu den meisten Zeitpunkten unter den zwei Standardabweichungen. Interessanterweise war dies der Patient mit der größten Behinderung, mit einem EDSS von vier und einem progredienten Verlauf. Vom Beginn der Interferon-Therapie an, zum Zeitpunkt drei, zeigte Patient EB tendenziell einen Anstieg der Apoptoserate.

4. Diskussion

4.1. Methoden zur Quantifizierung autoreaktiver T-Zellen

Die endgültigen Pathomechanismen die zur Multiplen Sklerose, einer chronisch entzündlichen Erkrankung des ZNS, führen, sind noch nicht geklärt. Die gängige Hypothese misst autoreaktiven T-Zellen eine zentrale Bedeutung bei. Die bei dieser Erkrankung hervorgerufene Demyelinisierung lässt als potentiell Autoantigen Myelinbestandteile vermuten. So konnte gezeigt werden, dass ein aus einem MS-Patienten isolierter MBP-Peptid-spezifischer T-Zell Klon, in einem transgenen humanen T-Zell Rezeptor enthaltendem Mausmodell, entzündliche Läsionen mit Infiltration dieser Zellen in das ZNS hervorrufen kann (Quandt JA et al., 2004).

Die ex-vivo Identifizierung und Quantifizierung dieser Myelin-spezifischen T-Zellpopulation ist eine technische Herausforderung. Das Hauptproblem ist die niedrige Frequenz Myelin-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut. Zur Quantifizierung und funktionellen Charakterisierung dieser Zellen ist eine Expansion mittels intensiver Zellkultur nötig. Das kann mit erheblichen in-vitro Manipulationen einhergehen, was die Aussagekraft beeinflussen kann. Beispielsweise konnte nur in Anwesenheit eines die Apoptose blockierenden CD95-Antikörpers eine höhere Frequenz autoreaktiver T-Zellen bei MS-Patienten nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass dieser Frequenzunterschied, durch AICD in der Kultur, überdeckt wird (Zang YC et al., 1999). Zum Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen sollten aus diesem Grund Methoden eingesetzt werden, bei denen Manipulation so gering wie möglich gehalten wird.

Technische Innovationen machen zusehens die ex-vivo Detektion autoreaktiver Zellen möglich. Eine dieser Methoden ist das Computer-assistierte ELISPOT-Assay, welches für die Quantifizierung Myelin-spezifischer Zellen von Pelfrey et al. angewandt wurde (Pelfrey CM et al., 2000). In Vorversuchen wurde diese Methode im Rahmen dieses Projekts getestet. Es konnte Reaktivität auf Myelinbestandteile nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Inkubationszeit liegt bei diesem Ansatz über 24 Stunden. Auf Durchflusszytometrie basierende Techniken ermöglichen ebenfalls ex-vivo Detektion. Altman et al. färbte direkt Peptid-MHC Tetramere, wobei diese Methode auf T-Zellen die ein bestimmtes Peptid erkennen und auf ganz spezifische Major Histocompatibility Komplexe limitiert bleibt (Altman JD et al., 1996). Ein anderer Ansatz beinhaltet eine Peptid-spezifische Induktion der Zytokinsynthese, gefolgt von intrazellulärer Zytokinfärbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern (Kern F et al., 1998). Diese Methode der durchflusszytometrischen Messung erlaubt ein T-Zell Epitop Mapping

unabhängig von MHC und eine weitere Charakterisierungen der reagierenden Zellpopulation wäre über Magnetbeats denkbar. Zum CD4⁺/CD8⁺ Epitop Mapping viraler Antigene wurde diese Methode erfolgreich eingesetzt (Kern F et al., 1998; 2000). Die Peptid-spezifische Induktion von Zytokinen braucht bei dieser Methode nur eine Antigenstimulationszeit von sechs Stunden, so dass die geforderten Kriterien für möglichst wenig in-vitro Manipulation zum Nachweis Myelin-spezifischer T-Zellen erfüllt worden sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit versucht mit dieser Methode Myelin-spezifische T-Zellen zu detektieren und zu quantifizieren. Die andere verwandte Methode, der IL-7 modifizierte Proliferationsassay, hat ebenfalls nur einen Stimulationszeitpunkt. Zur Expansion der Zellen wird der Proliferationstest mit einem Zytokin, Interleukin-7, durchgeführt (Bielekova B et al., 1999). IL-7 zeigt wachstumsfördernde Effekte auf aktivierte T-Zellen ohne deren Phänotyp zu beeinflussen (Vella AT et al., 1997; Bielekova B et al., 1999). Über die Hemmung des Aktivierungs-induzierten Zelltodes vorher aktivierter Zellen durch IL-7 wird die Sensitivität des Proliferationstests erhöht. Mit beiden Methoden wurde ein Peptidpool, bestehend aus mehreren Myelinantigenen und MBP-Protein bei MS-Patienten und Gesunden getestet, um der Frage nachzugehen, ob der Nachweis Myelin-spezifischer T-Zellen möglich sei und ob Unterschiede in der Reaktivität bei MS-Patienten und gesunden Kontrollen auszumachen seien.

In nur drei von 33 untersuchten Patienten und in zwei von 24 gesunden Kontrollen konnte mit der 4-Farb-Durchflusszytometrie eine CD4⁺ T-Zell Population, die auf Stimulation IFN- γ /TNF- α , produzierte, nachgewiesen werden. Immerhin konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode der Nachweis aktivierter Myelin-spezifischer CD4⁺ T-Zellen nach Kurzzeitstimulation möglich ist und sich diese quantifizieren lassen. Im IL-7 modifizierten Proliferationsansatz zeigten mehr Individuen Reaktivität auf Myelinantigen. So konnte bei 17 der 37 untersuchten MS-Patienten und bei 12 von 24 untersuchten Kontrollen eine T-Zell Proliferation auf Stimulation mit einem Myelinbestandteil nachgewiesen werden. Dieser Unterschied könnte sich dadurch erklären lassen, dass in der durchflusszytometrischen Methode, bedingt durch die kurze Stimulationszeit, in-vivo voraktivierte Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen detektiert wurden, wohingegen der Proliferationsassay noch zusätzlich ruhende Gedächtnis- und naive T-Zellen ansprach.

4.2. Myelinantigen – Bedeutung für die Pathogenese der MS

In der Durchflusszytometrie reagierten die PBMCs, isoliert aus MS-Patienten auf MBP-Gesamtprotein, auf PLP_{Br2}, PLP_{IE}, MOG_{IE} und MOBP_{IE}. Die zwei gesunden Individuen zeigten eine CD4+ IFN- γ /TNF- α produzierende Population auf MBP-Gesamtprotein und MOG_{IE}.

Im Proliferationsassay konnte Proliferation sowohl im MS-Kollektiv als auch im Kontrollkollektiv auf alle untersuchten Myelinbestandteile nachgewiesen werden. Es fiel allerdings auf, dass PLP-Antigen in der Durchflusszytometrie nur bei MS-Patienten zur Zytokinproduktion führte und im IL-7 modifizierten Proliferationsassay mehr Patienten eine Antwort auf PLP_{IE} als Gesunde zeigten. Zusätzlich waren die Stimulationsindizes im IL-7 modifizierten Proliferationsassay bei MS-Patienten höher, wenngleich keine statistische Signifikanz bestand.

PLP_{IE} ist ein immundominanter Bereich des Proteolipid Protein, welches den Hauptbestandteil des Myelins des ZNS ausmacht. Andere Arbeitsgruppen konnten in Proliferationstests bei MS-Patienten eine signifikant höhere Antwort auf diese Region, welche die Aminosäuren aa184-203 umfasst, nachweisen (Markovic-Plese S et al., 1995; Greer JM et al., 1997; Pender MP et al., 2000). In einem ELISPOT-Assay konnte nach Stimulation mit diesem Peptid eine deutlich höhere Anzahl IFN- γ produzierender T-Zellen bei MS-Patienten als bei Gesunden isoliert werden (Pelfrey CM et al., 2000). Dass die unterschiedlichen Parameter messenden Methoden, zum eine Proliferation zum anderen Zytokinproduktion, eine höhere Antwort im Kollektiv der Patienten aufweist, unterstreicht die mögliche Bedeutung von PLP_{IE} für die Pathogenese der MS. Ein weiterer interessanter Myelinbestandteil ist PLP aa139-151, hier umspannt durch die überlappenden Peptide PLP_{Br1}, PLP_{Br2}, PLP_{Br3}. Diese Schleife von 35 Aminosäuren fehlt dem PLP-Protein im Thymus (Klein L et al., 2000). Im Rahmen von zentraler Toleranzinduktion im Thymus, könnte dieser Bereich als „fremd“ angesehen und somit eine Immunreaktion, wie beispielweise bei der MS im ZNS, wo das Gesamtprotein vorkommt, hervorgerufen werden. Im Tiermodell EAE kennt man diesen Bereich als immundominant. Bei Tuohy et al. wurde PLP₁₂₂₋₁₂₉, welches hier PLP_{Br2} entspricht, verstärkt von T-Zellen HLA-DR2 positiver MS-Patienten erkannt (Tuohy VK et al., 1997). Im bereits erwähnten ELISPOT-Assay waren bei MS-Patienten auf Stimulation mit Peptiden dieses Bereichs mehr IFN- γ produzierende T-Zellen detektierbar (Pelfrey CM et al., 2000). Andere Arbeiten beschreiben zwar Reaktivität, sehen hingegen diesen Bereich nicht als immundominant an (Markovic-Plese S et al., 1995; Trotter JL et al., 1998).

Die Ergebnisse, bezogen auf diesen Bereich, stellen sich im IL-7 modifizierten Proliferationsansatz heterogen dar. Die Stimulation mit PLP_{Br3} führte in 22% aller untersuchter

MS-Patienten zu einer Proliferation. Das war dreimal so hoch, wie in der Kontrollgruppe, wo nur 7% darauf reagierten. Die beiden anderen Peptide, PLP_{Br1} und PLP_{Br2}, riefen sogar häufiger bei gesunden Individuen eine T-Zellantwort hervor.

Bei den anderen untersuchten Myelinbestandteilen fiel auf, dass auf MOBP_{IE} vermehrt PBMCs von MS-Patienten eine Proliferation zeigten, 17% MS versus 7% Kontrolle. Der kumulative Stimulationsindex als Maß der T-Zellreaktivität war ebenfalls deutlich höher. Nach Stimulation wurde in dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie bei einem MS-Patienten eine CD4+ IFN- γ /TNF- α produzierende Population nachgewiesen, bei einem Gesunden gelang der Nachweis nicht. Holz et al. erhielt auf dieses Peptid, welches die Aminosäure 21-39 umfasst, eine verstärkte Proliferationsantwort im MS-Kollektiv (Holz A et al., 2000). Myelin assoziiertes Oligodendrozytisches Basisches Protein (MOBP) ist der dritthäufigste Myelinbestandteil und wird vornehmlich von Oligodendrozyten exprimiert (Yamamoto Y et al., 1994). Das Protein scheint zur Aufrechterhaltung der Myelinstruktur eine Rolle zu spielen, so dass eine Autoimmunreaktion dagegen in Zerstörung der Myelinscheide münden könnte (Holz et al., 1996). Unterstrichen wird die Bedeutung, die das Protein für die Pathogenese der MS spielen könnte, durch eine 18-monatigen Verlaufsuntersuchung an 10 RRMS-Patienten. Dabei zeigte sich, dass die Detektion einer Antigen-spezifischen CD4+-T-Zell Antwort auf MOBP mit der Krankheitsaktivität, ermittelt durch EDSS und MRT-Bildgebung des Schädels, korrelierte (Arbour N et al., 2003).

4.3. „Epitop Spreading“

Hat man das gesamte Spektrum der Reaktivität im IL-7 modifizierten Proliferationsassay im Blick, sieht man, dass im Kollektiv der MS-Patienten alle Myelinbestandteile erkannt wurden. PBMCs von sieben Patienten haben nur ein Epitop erkannt, wohingegen zehn zwei oder mehr erkannten. Zwei Individuen, MS2 und MS15, reagierten sogar auf mehr als fünf Peptidpools. In der EAE konnte gezeigt werden, dass nach primärer Induktion mit einem Myelin-spezifischen Peptid im Verlauf der Chronifizierung weitere Myelinantigene erkannt werden (Lehmann PV et al., 1992; Vanderlugt CL et al., 2000). T-Zell Untersuchungen von Patienten mit isolierten monosymptomatischen demyelinisierenden Syndromen zeigten, dass die Progression zu einer klinisch definierten MS mit einer T-Zell Antwort auf ein breiteres Spektrum an Peptiden einhergehen kann (Tuohy VK et al., 1997; 1999). Dieses Phänomen wird als „Epitop spreading“ bezeichnet. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es während der Entzündung und Schädigung des ZNS zu einem endogenen Priming von T-Zellen durch APCs gegenüber

weiterem Antigen kommt. In zwei Mausmodellen der MS konnte nachgewiesen werden, dass naive PLP aa139-151 spezifische T-Zellen in das entzündliche ZNS von mit PLP aa178-191 induzierten EAE Mäusen eindringen konnten, um dort von dendritischen Zellen das endogene Antigen präsentiert zu bekommen und aktiviert zu werden (McMahon EJ et al., 2005).

Beim Vergleich der klinischen Daten der untersuchten MS-Patienten mit den Labordaten fiel auf, dass MS15, welcher auf alle Myelinbestandteile reagierte, einen sekundär-progredienten Krankheitsverlauf (SPMS) mit einer Krankheitsdauer von über zehn Jahren hatte und sogar drei Wochen vor Blutabnahme ein Schub zu verzeichnen war. Allerdings zeigten andere Patienten mit SPMS, wie MS10, MS11 nur Proliferation auf einen Peptidpool. Dass bei dieser Untersuchung keine Korrelation zwischen Erkrankungsdauer bzw. Verlauf der Erkrankung und Anzahl der erkannten Myelinantigene bestand, wird deutlich wenn man die Klinik von MS2, RRMS, Krankheitsdauer von sechs Jahren und keinen Schub während der Blutabnahme, mit Proliferation auf sechs Antigene betrachtet. In einer über sechs Jahre durchgeführten Studie an fünf unbehandelten MS-Patienten mit RRMS und vier Kontrollpersonen, die die Epitop Spezifität auf MBP untersuchte, konnten drei Muster ausgemacht werden. Zwei Patienten und drei Kontrollen zeigten Antworten auf ein breites Spektrum über den Verlauf, zwei Patienten boten initial eine fokussierte Antwort, die sich über den Verlauf verbreiterte und ein Patient sowie eine Kontrollperson zeigten über den gesamten Verlauf nur Antworten auf Epitope der Region MBP aa83-102 (Goebels N et al., 2000). Möglicherweise unterstützen auch diese Daten die Hypothese, dass sich hinter dem Krankheitsbild MS ein heterogenes Geschehen verbirgt.

4.4. Frequenz Myelin-spezifischer T-Zellen

Dass das bloße Vorhandensein Myelin-spezifischer T-Zellen nicht zur Induktion der MS ausreicht, belegen die gesunden Individuen, bei denen mit beiden hier eingesetzten Methoden diese T-Zellen nachweisbar waren. Fast alle Arbeitsgruppen, die sich mit diesem Thema beschäftigen, kennen dieses Phänomen (Hohlfeld R und Wekele H, 2004), so dass die Frage nach Unterschieden in der Frequenz oder im Aktivierungszustand dieser Zellen bei MS-Patienten aufgeworfen wird.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten hier Frequenzen aktivierter Myelin-spezifischer Zytokin-produzierender T-Zellen angegeben werden. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten (Olsson T et al., 1992; Zhang J et al., 1994; Hong J et al., 2004), erbrachte diese Untersuchung keinen Unterschied in der Frequenz, wobei dieses Ergebnis, bedingt durch die geringe Fallzahl, nicht repräsentativ ist. Der Mittelwert \pm Standardfehler bei den MS-Patienten war $0,031\% \pm 0,002\%$

verglichen mit $0,037\% \pm 0,029\%$ in der Kontrollgruppe. Bezogen auf 2 Millionen eingesetzte PBMCs bedeutet das eine Vorläuferfrequenz von ca. 300. Die ermittelte Frequenz lag um das 100fache über der mit Limiting-Dilution Assay bestimmten. Die mit dieser Methode gemessenen Frequenzen lagen zwischen 3,36 und 0,19 jeweils bezogen auf 1 Million eingesetzter PBMCs. Ähnliche Angaben zu Myelin-spezifischen Zellen, bestimmt mit Proliferationsassays, wurden von anderen Gruppen berichtet (Bielekova B et al., 2000; Pender MP et al., 2000). Bei der Interpretation dieser divergenten Frequenzen muss man sich die unterschiedlichen Messparameter beider Methoden vor Augen halten. Zum einen wurde die Proliferation, zum anderen die Zytokinproduktion auf einen Stimulus hin bestimmt. Die Durchflusszytometrie detektiert ex-vivo frühe Ereignisse von Gedächtnis- und Effektor-T-Zell Aktivierung, wohingegen im Limiting-Dilution Assay erst nach einer einwöchigen in-vitro Kultivierung gemessen wird. Außerdem könnte es sein, dass mit der schnellen Peptid-spezifischen Induktion der Zytokinsynthese der Effekt des AICDs oder die Induktion von Anergie umgangen wird. So könnten Assays, basierend auf Proliferation, die Zahl der autoreaktiven Effektor- und Gedächtnis T-Zellen wesentlich niedriger abbilden, als sie in-vivo ist. Diese Hypothese wird durch eine andere Methode unterstützt, die zur Quantifizierung möglicher krankheitsrelevanter T-Zellen die ex-vivo PCR Amplifikation von T-Zell Rezeptoren (TCR) Transkripten einsetzt. Diese TCR-Transkripte wurden nach vorausgehender Stimulation von T-Zellen mit einem immundominanten Myelinpeptid, MBP aa85-99, sequenziert. Unter Umgehung des AICD zeigte diese Vorangehensweise Frequenzen von T-Zellen, welche eine individuelle TCR-Kette erkannten, von 1 in 300 (Bieganowska KD et al., 1997). Eine weitere Arbeit, welche unterschiedliche Methoden, Proliferation, ELISPOT und eine auf TCR-Sequenz basierte ex-vivo Detektion, zur Bestimmung der Vorläuferfrequenz MBP-spezifischer T-Zellen im gleichen Kollektiv verglich, bestätigt diese Ergebnisse. Mittels Proliferation zeigte sich eine Vorläuferfrequenz von 2.3×10^{-6} eingesetzte PBMCs, im ELISA 3.9×10^{-5} und in der ex-vivo Detektion, wobei hier zur Detektion Koloniehybridisierung mit Oligonukleidsonden spezifisch für CDR3 MBP-spezifischer T-Zellklone ohne vorherige Stimulation mit MBP eingesetzt wurde, 1.6×10^{-4} . Interessanterweise waren die Vorläuferfrequenzen bei den Patienten um das sechsfache höher als bei den Kontrollen (Hong J et al., 2004).

4.5. T-Zellreaktivität als Biomarker

Neben der Klinik ist derzeit das MRT das gängige Instrument zum Monitoren des Verlaufs und der Therapie der Multiplen Sklerose. Momentan gibt es keinen standardisierten

immunologischen Parameter der im klinischen Alltag zur Verlaufs- oder Therapiekontrolle eingesetzt wird. Ein solcher Biomarker sollte ein Parameter sein, der verlässlich normale biologische Prozesse oder pathogene oder pharmakologische Antworten auf eine therapeutische Intervention wiedergibt. Von einem guten Biomarker sollte eine starke und signifikante Korrelation zur Klinik gefordert werden, zum anderen sollte er negative und positive Einflüsse von Behandlungen möglichst komplett abbilden (Bielekova B und Martin R, 2004). Wohlwissend dass es schwierig ist beide Punkte zu erfüllen, sollte man bei der Evaluierung, ob ein Parameter als Biomarker dienen könne, dies im Hinterkopf haben.

Bei der Multiplen Sklerose sind in vielen Arbeiten immunologische Parameter beschrieben worden, die teilweise mit Krankheitsaktivität der RRMS assoziiert waren. So ließen sich beispielsweise erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine (Navikas V und Link H, 1996), die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle (Dore-Duffy P et al., 1995), Zell-Aktivitätsmarker (Okuda Y et al., 2005), Matrixmetalloproteinasen (Kieseier BC et al., 1998) oder Calcium-Ströme bei T-Zellen (Martino G et al., 1996) mit Krankheits- oder MRT-Aktivität korrelieren.

Im Rahmen dieser Arbeit interessierte, ob eine Myelin-spezifische T-Zell Antwort eine Stabilität über einen bestimmten Verlauf aufweist und ob die Reaktivität auf ein Myelinantigen mit Krankheitsaktivität und Abklingen in Einklang gebracht werden kann. Da im IL-7 modifizierten Proliferationsassay bei 46% der untersuchten Patienten eine Myelin-spezifische Reaktivität nachgewiesen wurde, wurde diese Methode bei der Verlaufsuntersuchung eingesetzt. Über einen viermonatigen Zeitraum wurde alle zwei Wochen die T-Zellreaktivität auf MBP-Gesamtprotein und Tetanus-Toxoid (TT) an sechs MS-Patienten und sechs Kontrollpersonen gemessen. Wie in der Querschnittsuntersuchung reagierten sowohl Patienten als auch Gesunde auf MBP-Gesamtprotein. Im Vergleich aller Mittelwerte der T-Zellreaktivität auf MBP zu allen Zeitpunkten zeichnete sich im Kollektiv der MS-Patienten eine signifikant höhere T-Zell-Reaktivität, bei gleich hoher Reaktivität auf TT, ab. Ein starker Anstieg der T-Zellreaktivität, was bedeutete, dass diese mindestens zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Kontrollen lag, zeigte sich bei den MS-Patienten fünf mal, bei den Kontrollen nur zu einem Zeitpunkt. Ob eine höhere T-Zellreaktivität mit einer höheren Frequenz oder einem anderen Aktivierungsstatus dieser Myelin-spezifischen Zellen einhergeht, lässt sich mit diesem Assay nicht klären. In einer auf Proliferation basierenden Längsuntersuchung konnten über einen Jahreszeitraum höhere T-Zell-Frequenzen auf Stimulation mit MBP-Gesamtprotein im Kollektiv der MS-Patienten gesehen werden, mit steilen Frequenzanstiegen, die teilweise mit Krankheitsaktivität korrelierten (Pender MP et al., 2000). Bei dieser Untersuchung konnte von

den oben erwähnten fünf starken Anstiegen in der T-Zellreaktivität einer mit einem Schubgeschehen assoziiert werden (Patient HK). Zwei Schübe eines Patienten (Patient EB) im Verlauf zeigten keine Assoziation. Die drei hintereinanderfolgenden hohen Proliferationsindizes eines weiteren MS-Patienten waren mit einem parallelen Anstieg auf Tetanus-Toxoid vergesellschaftet, so dass hier von einer generellen Aktivierung des Immunsystems auszugehen ist (Patient CA). Legt man die oben genannten Kriterien an, wird klar, dass die mit diesem Assay gemessene Proliferation nicht als Biomarker verwandt werden kann, auch wenn in einem Fall ein Schubereignis mit starker Proliferation einherging.

In einer anderen Längsschnittuntersuchung konnte bei manchen Patienten parallel zur MRT-Aktivität eine Zunahme Myelin-spezifischer IFN- γ sezernierender T-Zellen, klonale Expansion und Heraufregulation von Adhäsionsmolekülen detektiert werden (Hellings N et al., 2002). Dass allerdings einige dieser Veränderungen auch im Kollektiv der Kontrollen gesehen wurden, spricht für zusätzliche Regulationsmechanismen der T-Zell-Antwort, welche möglicherweise bei der MS gestört sind.

4.6. Apoptoseresistenz als Pathomechanismus der MS

Es gibt Hinweise, dass Apoptosemechanismen bei der MS dysreguliert sind, was zur Persistenz autoreaktiver T-Zellen beitragen und somit die entzündliche Immunreaktion im ZNS unterhalten könnte (Pender MP, 1998). In-vitro Studien konnten eine gestörte apoptotische Deletion Myelin-spezifischer T-Zellen in MS-Patienten nachweisen (Macchi B et al., 1999). Diese These wird unterstützt durch ein erhöhtes Vorkommen von löslichem, antiapoptotischem CD95 im Serum von MS-Patienten (Zipp F et al., 1998b). Zwar konnte eine andere Arbeit dies nicht reproduzieren, fand aber eine erhöhte intrathekale CD95 Produktion bei MS sowie eine verminderte apoptotische Rate in Liquorzellen bei MS-Patienten verglichen mit Kontrollen (Ciusani E et al., 1998). In einem AICD-in-vitro Modell, welches der Elimination Antigen-reaktiver T-Zellen in-vivo nachempfunden wurde, wurde eine verminderte AICD polyklonaler T-Zellen im Kollektiv der MS-Patienten festgestellt (Waiczies S et al., 2002). Dieses Protokoll wurde bei den Verlaufsuntersuchungen an sechs MS-Patienten und sechs Kontrollen im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Im viermonatigen Verlauf konnte ein niedrigerer apoptotischer Index und somit eine erhöhte Apoptoseresistenz bei den MS-Patienten gesehen werden. Entsprechend dieser Ergebnissen konnte eine Verminderung des CD95-vermittelten Zelltodes und der Spontanapoptose (Sharief MK, 2000) in MS-Patienten, wobei die Gruppe der SPMS die niedrigsten Werte aufwies, gezeigt werden (Comi C et al., 2000). Dass Patient HK mit

SPMS im Verlauf die niedrigsten apoptotischen Indizes aufwies, könnte dafür sprechen, dass die Dysregulation des AICD zur Progression der Erkrankung beitragen könnte. Unterstützt wird dies durch Daten der EAE, wo CD95-defiziente Mäuse einen chronisch-progredienten Verlauf aufweisen (Malipiero U et al., 1997).

Die relative Apoptoseresistenz von T-Zellen bei MS-Patienten ist über mehrere Mechanismen erklärbar. Neben dem oben erwähnten Apoptoseinhibitor lösliches CD95, könnte die Hochregulation anti-apoptotischer Proteine, wie Bcl-2, Bcl-xL oder FLIP, eine Rolle spielen. Bcl-xL transgene Mäuse zeigen in der EAE einen früheren Krankheitsbeginn, einen schwereren Krankheitsverlauf und eine verminderte Remissionstendenz, die immunhistologisch mit einer verminderten Apoptoserate im ZNS einhergeht (Issazadeh S et al., 2000). Auch bei der MS konnte parallel zu einer erhöhten Resistenz gegenüber AICD, eine erhöhte Bcl-xL Konzentration auf Proteinebene gemessen werden (Waiczies S et al., 2002). Im Gegensatz dazu fand sich keine Korrelation zwischen erhöhtem Bcl-2 und Apoptoseresistenz (Semra YK et al. 2001). Erhöhte FLIP mRNA-Expression konnte in unstimulierten PBMCs bei RRMS nachgewiesen werden (Gomes AC et al., 2003). Eine andere Gruppe sah keinen Unterschied in der Proteinexpression bei stabiler RRMS und Kontrollen, konnte aber eine verstärkte Expression von FLIP in T-Zellen und Resistenz dieser gegenüber CD95-vermittelter Apoptose bei Patienten mit klinisch aktiver MS nachweisen (Semra YK et al., 2001). Die Veränderung der mRNA Expression von CD95 und CD95L während klinischer Aktivität unterstreicht die Bedeutung, die dieses System für die MS spielen könnte. So konnte in Anwesenheit von Gadolinium anreichernden Läsionen im MRT bei MS-Patienten eine verminderte CD95- und Kaspase 8-Genexpression in T-Lymphozyten gesehen werden (Gomes AC et al., 2003b). Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Arbeit während der klinischen Aktivität eine Zunahme der CD95 Expression und eine Abnahme des CD95-Ligand. Bei der Analyse der CD95 Expression mittels Durchflusszytometrie konnte während der Krankheitsaktivität ein höheres Verhältnis CD8+CD95+ T-Lymphozyten bei MS-Patienten, verglichen mit Kontrollen, gesehen werden, wobei dies für CD4+/CD95+ T-Zellen nicht galt (Petelin Z et al., 2004).

In dieser Untersuchung konnte keine Korrelation zwischen Aktivität und erhöhter Apoptoseresistenz bei den Verlaufsuntersuchungen aufgezeigt werden, wobei die niedrige Patientenzahl (n=6), der kurze Verlauf und die Heterogenität im Patientenkollektiv bedacht werden muss.

Im Verlauf von Patient EK fällt ab Zeitpunkt drei eine Zunahme des apoptotischen Index und somit eine Abnahme der Apoptoseresistenz auf, welche im Zusammenhang mit der ab Zeitpunkt

drei begonnenen Interferon-beta Therapie stehen kann. Obwohl die exakten Wirkmechanismen der beiden rekombinanten Interferon-beta (1a und 1b) noch nicht gänzlich geklärt sind, konnte gezeigt werden, dass dieser Immunmodulator Apoptose induzieren kann (Kaser A et al., 1999) Auch wenn es scheint, dass Interferon-beta nicht über einen direkten Weg Apoptose in Myelin-spezifischen T-Zellen induziert (Zipp F et al., 2000), mehren sich Hinweise, dass es über die Modulation von Apoptose regulierenden Proteinen, z.B. über die Downregulation von anti-apoptotisch wirkendem TGF- β 1 (Lünemann JD et al., 2001) und FLIP (Sharief MK et al., 2001) agiert und somit die Suszeptibilität der Zellen für Apoptose erhöht.

Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Myelin-spezifische T-Zellen mit zwei Methoden, die mit wenig in-vitro Manipulation auskommen, nachgewiesen werden. Um insbesondere die Durchflusszytometrie zur ex-vivo Detektion Myelin-spezifischer T-Zellen einsetzen zu können, bedarf es jedoch Weiterentwicklungen, um die Detektionsgrenze herabzusetzen. Auch wenn es Hinweise gibt, dass Frequenzunterschiede Myelin-spezifischer T-Zelle zwischen MS-Patienten und Gesunden bestehen, konnte hier, bei einer geringen Fallzahl, kein Unterschied gezeigt werden. Eine erhöhte T-Zellreaktivität auf Myelinbestandteile bei Patienten und niedrigere Apoptoseraten unterstreichen die Hypothese, dass Myelin-spezifische T-Zellen und Dysregulation der Apoptose zur Pathogenese der MS beitragen könnten. Weitere Untersuchungen werden benötigt, die der Frage nach phänotypischen Unterschieden Myelin-spezifischer T-Zellen bei MS-Patienten und Gesunden nachgehen. Um Therapieerfolge überwachen zu können, aber auch um Wirkmechanismen von Therapien nachvollziehen zu können, laufen viele Untersuchungen auf der Suche nach geeigneten Biomarkern. Mit den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Verlaufsuntersuchungen, T-Zellproliferation auf MBP und Apoptoserate, ließ sich keine Korrelation zur Klinik aufzeichnen.

Bei der Multiplen Sklerose sind vielfältige pathophysiologische Prozesse, wie Entzündung, Demyelinisierung, axonaler und neuronaler Untergang zu beobachten. Histopathologische Untersuchungen konnten eine Heterogenität der MS Läsionen zeigen, so dass die Frage aufgeworfen wurde, ob sich hinter dem Begriff der Multiplen Sklerose unterschiedliche Krankheiten mit unterschiedlichen therapeutischen Ansätzen verbergen. Um dies zu beantworten bedarf es einer weiteren Erforschung der Pathomechanismen. Auf diesen basierend sollten geeignete Biomarker gefunden werden, mit deren Hilfe in Zukunft eine auf den jeweiligen Verlauf angepasste Therapieentscheidung getroffen werden kann.

5. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems. Die in den entzündlichen Infiltraten enthaltenen T-Lymphozyten, die Möglichkeit der Induktion entzündlicher ZNS-Läsionen im Tiermodell durch Myelin-spezifische T-Zellen sowie das Ansprechen der Erkrankung auf immunsuppressive und -modulatorische Therapie, stützen die Hypothese einer T-Zell vermittelten Autoimmunreaktion als möglicher Pathogenesefaktor. Die für dieses Krankheitsbild typische Demyelinisierung legt nahe, in Myelinbestandteilen Antigene autoreaktiver T-Zellen zu sehen. Der Nachweis Myelin-spezifischer T-Zellen gelingt sowohl aus dem Blut von MS-Patienten als auch von Gesunden, so dass das alleinige Vorhandensein dieser Zellen nicht ausschlaggebend für die Erkrankung sein kann. Möglicherweise triggern phänotypische Unterschiede, unterschiedliche Aktivierungszustände oder Frequenzunterschiede dieser Zellen bei MS-Patienten die Erkrankung. Ferner mehren sich Hinweise, dass apoptotische Dysregulation eine Rolle bei der Pathogenese spielen könnte.

Um der Frage nach Unterschieden in der Frequenz Myelin-spezifischer T-Zellen und der Reagibilität auf bestimmte Myelinbestandteile bei MS-Patienten nachzugehen, wurden PBMCs von Patienten und Gesunden isoliert und mit Myelinantigen stimuliert. Zum einen wurde die Proliferation, zum anderen die Aktivierung CD4⁺-T-Zellen und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen dieser Zellen gemessen. Als Stimuli wurden neben MBP-Gesamtprotein weitere Myelinbestandteile ausgewählt, die durch die Lokalisation im Bereich der äußeren Myelinscheide und durch fehlende Expression im Thymus und somit möglicherweise fehlender Toleranzinduktion sowie durch enzephalitogene Wirkung im Tiermodell eine Rolle für die Pathogenese spielen könnten. Einige dieser Epitope sind als immundominant beschrieben worden.

Um möglichst ex-vivo den Nachweis und die Quantifizierung Myelin-spezifischer T-Zellen zu führen, wurden im Gegensatz zu vielen Arbeiten zu diesem Thema zwei Methoden eingesetzt, die mit kurzen Inkubationszeiten und nur einem Stimulationszeitpunkt auskamen. Hierbei handelte es sich um eine 4-Farb-durchflusszytometrische Messung, zum Nachweis proinflammatorischer Zytokin produzierender CD4⁺ T-Zellen und um einen IL-7 modifizierten Proliferationsassay.

Auch wenn der Nachweis einer distinkten aktivierten IFN- γ /TNF- α produzierenden CD4⁺ T-Zellpopulation nur bei sehr wenigen der untersuchten Probanden gelang, konnten Myelin-

spezifische CD4⁺ T-Zellen nach Kurzzeitstimulation quantifiziert werden. Über die 4-Farbdurchflusszytometrische Messung ließ sich kein Frequenzunterschied bei MS-Patienten und Gesunden nachweisen. Interessanterweise lagen die so ermittelten T-Zellfrequenzen um das 100fache höher als die mit einem Limiting-Dilution Assay bestimmten.

In dem IL-7 modifizierten Proliferationsassay konnte Reaktivität auf alle eingesetzten Myelinbestandteile sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen nachgewiesen werden. Zwar ließ sich mit dieser Methode keine Frequenz ermitteln, jedoch wenn der kumulative Stimulationsindex als Maß der Reagibilität verwandt wurde, zeigte sich auf manche Myelinbestandteile bei Patienten eine höhere T-Zellreaktivität. Neben der erhöhten T-Zellreaktivität auf PLP_{IE} und MOBP_{IE} bei MS-Patienten reagierten auch mehr Patienten auf diese Epitope, was die Bedeutung dieser Myelinbestandteile für die Pathogenese unterstreichen könnte. Hinsichtlich Krankheitsaktivität und Verlaufsform der MS, RRMS und SPMS, ließ sich, bezogen auf das Spektrum der erkannten Myelinbestandteile, kein Unterschied festmachen.

Die gängigste Methode zur Verlaufsbeurteilung der MS und zur Beurteilung des Therapieansprechens ist derzeit neben der Klinik die Kernspintomographie. Von einem guten Biomarker sollte zum einen eine starke und signifikante Korrelation zur Klinik gefordert werden, zum anderen sollte er negative und positive Einflüsse von Therapien möglichst komplett abbilden. Zu Beantwortung der Frage, ob eine Myelin-spezifische T-Zellantwort oder eine verminderte Apoptoserate als ein solcher Marker dienen könnte, wurde die proliferative Reaktivität auf MBP-Gesamtprotein und die Apoptoserate über einen viermonatigen Zeitraum bei sechs Patienten und sechs gesunden Kontrollen untersucht. Zur Proliferationsuntersuchung wurde der IL-7 modifizierte Ansatz gewählt. Die Höhe der T-Zellreaktivität wurde mit den klinischen Verläufen der Patienten verglichen. Nur in einem Fall konnte ein Anstieg der T-Zellreaktivität mit einem akuten Schubereignis assoziiert werden. Zusammengenommen fielen die kumulativen Stimulationsindizes auf MBP-Protein bei den Patienten höher aus als in der Kontrollgruppe. Mit dem Apoptoseindex gelang ebenfalls keine Assoziation zu einzelnen klinischen Verläufen. Interessanterweise zeigte jedoch die Gesamtzahl der untersuchten MS-Patienten eine niedrigere Apoptoserate als die Kontrollen. Dies zusammen mit der Beobachtung, dass der Patient mit SPMS und mit dem höchsten Grad der Behinderung die niedrigsten Apoptoseindizes zeigte, unterstreicht die Hypothese der Dysregulation der Apoptose als begünstigenden Faktor der MS.

6. Literaturverzeichnis

Adams JM, Cory S. **The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.** Science. 1998 Aug 28;281(5381):1322-6.

Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G et al. **Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglipathy.** Am J Pathol. 1998 Sep;153(3):801-13.

Aktas O, Smorodchenko A, Brocke S et al. **Neuronal Damage in Autoimmune Neuroinflammation Mediated by the Death Ligand TRAIL.** Neuron. 2005 May 5;46(3):421-32.

Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T et al. **Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes.** J Exp Med. 1995 Jan 1;181(1):71-7.

Altman JD, Moss PA, Goulder PJ et al. **Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.** Science 1998 Jun 19;280(5371):1821-4.

Amos CL, Woetmann A, Nielsen M et al. **The role of caspase 3 and BclxL in the action of interleukin 7 (IL-7): a survival factor in activated human T cells.** Cytokine. 1998 Sep;10(9):662-8.

Anderson AC, Nicholson LB, Legge KL, Turchin V, Zaghouani H, Kuchroo VK. **High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire.** J Exp Med. 2000 Mar 6;191(5):761-70.

Arbour N, Holz A, Sipe JC et al. **A new approach for evaluating antigen-specific T cell responses to myelin antigens during the course of multiple sclerosis.** J Neuroimmunol. 2003 Apr;137(1-2):197-209.

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H et al. **Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction.** J Exp Med. 2000 Aug 7;192(3):393-404.

Bieganowska KD, Ausubel LJ, Modabber Y, Slovik E, Messersmith W, Hafler DA. **Direct ex vivo analysis of activated, Fas-sensitive autoreactive T cells in human autoimmune disease.** J Exp Med. 1997 May 5;185(9):1585-94.

Bielekova B, Muraro PA, Golestaneh L, Pascal J, McFarland HF, Martin R. **Preferential expansion of autoreactive T lymphocytes from the memory T-cell pool by IL-7.** J Neuroimmunol. 1999 Dec;100(1-2):115-23.

Bielekova B, Goodwin B, Richert N et al. **Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand.** Nat Med 2000 Dec;6(12):1412.

Bielekova B, Martin R. **Development of biomarkers in multiple sclerosis.** Brain. 2004 Jul;127(Pt 7):1463-78.

Boucher A, Desforges M, Duquette P, Talbot PJ. **Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients.** Clin Immunol. 2007 Jun;123(3):258-67.

Brunner T, Mogil RJ, LaFace D et al. **Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas.** Nature. 1995 Feb 2;373(6513):441-4.

Bruno R, Sabater L, Sospedra M et al. **Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus.** Eur J Immunol. 2002 Oct;32(10):2737-47

Brück W, Porada P, Poser S et al. **Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions.** Ann Neurol. 1995 Nov;38(5):788-96

Charcot M. **Histologie de la sclérose en plaques.** Gaz Hop. 1868, 141: 554-555

Ciusani E, Frigerio S, Gelati M et al. **Soluble Fas (Apo-1) levels in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients.** J Neuroimmunol. 1998 Feb;82(1):5-12.

Comi C, Leone M, Bonissoni S et al. **Defective T cell fas function in patients with multiple sclerosis.** Neurology. 2000 Oct 10;55(7):921-7.

Critchfield JM, Racke MK, Zuniga-Pflucker JC et al. **T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis.** Science. 1994 Feb 25;263(5150):1139-43.

Cutter GR, Baier ML, Rudick RA et al. **Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure.** Brain. 1999 May;122 (Pt 5):871-82.

Dean G, Kurtzke JF. **On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa.** Br Med J. 1971 Sep.

De Stefano N, Matthews PM, Fu L et al. **Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study.** Brain. 1998 Aug;121 (Pt 8):1469-77.

Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. **Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95).** Nature. 1995 Feb 2;373(6513):438-41.

Diehl HJ, Schaich M, Budzinski RM, Stoffel W. **Individual exons encode the integral membrane domains of human myelin proteolipid protein.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Dec;83(24):9807-11

Dore-Duffy P, Newman W, Balabanov R et al. **Circulating, soluble adhesion proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis: correlation with clinical activity.** Ann Neurol. 1995 Jan;37(1):55-62.

Dozmorov I, Eisenbraun MD, Lefkovits I. **Limiting dilution analysis: from frequencies to cellular interactions.** Immunol Today. 2000 Jan;21(1):15-8.

Dowling P, Shang G, Raval S, Menonna J, Cook S, Husar W. **Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain.** J Exp Med. 1996 Oct 1;184(4):1513-8.

Drappa J, Vaishnav AK, Sullivan KE, Chu JL, Elkon KB. **Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity.** N Engl J Med. 1996 Nov 28;335(22):1643-9.

D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V et al. **Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death.** J Exp Med. 1996 Dec 1;184(6):2361-70.

- Engelhardt B, Ransohoff RM. **The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms.** Trends Immunol. 2005 Sep;26(9):485-95
- Esiri MM. **Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques.** Lancet. 1977 Sep 3;2(8036):478
- Eylar EH, Kniskern PJ, Jackson JJ. **Myelin basic proteins.** Methods Enzymol. 1974;32(Part B):323-41
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. **Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions.** Brain. 1997 Mar;120 (Pt 3):393-9.
- Gaertner S, de Graaf KL, Greve B, Weissert R. **Antibodies against glycosylated native MOG are elevated in patients with multiple sclerosis.** Neurology. 2004 Dec 28;63(12):2381-3.
- Genain CP, Nguyen MH, Letvin NL et al. **Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate.** J Clin Invest. 1995 Dec;96(6):2966-74.
- Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. **Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis.** Nat Med. 1999 Feb;5(2):170-5.
- Goebels N, Hofstetter H, Schmidt S, Brunner C, Wekerle H, Hohlfeld R. **Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence.** Brain. 2000 Mar;123 Pt 3:508-18.
- Gomes AC, Jonsson G, Mjornheim S, Olsson T, Hillert J, Grandien A. **Upregulation of the apoptosis regulators cFLIP, CD95 and CD95 ligand in peripheral blood mononuclear cells in relapsing-remitting multiple sclerosis.** J Neuroimmunol. 2003 Feb;135(1-2):126-34.
- Gomes AC, Morris M, Stawiarz L et al. **Decreased levels of CD95 and caspase-8 mRNA in multiple sclerosis patients with gadolinium-enhancing lesions on MRI.** Neurosci Lett. 2003 Dec 4;352(2):101-4.
- Grabstein KH, Namen AE, Shanebeck K, Voice RF, Reed SG, Widmer MB. **Regulation of T cell proliferation by IL-7.** J Immunol. 1990 Apr 15;144(8):3015-20.

Greer JM, Csurhes PA, Cameron KD, McCombe PA, Good MF, Pender MP. **Increased immunoreactivity to two overlapping peptides of myelin proteolipid protein in multiple sclerosis.** Brain. 1997 Aug;120 (Pt 8):1447-60.

Hassan J, Reen DJ. **IL-7 promotes the survival and maturation but not differentiation of human post-thymic CD4+ T cells.** Eur J Immunol. 1998 Oct;28(10):3057-65.

Hellings N, Gelin G, Medaer R et al. **Longitudinal study of antimyelin T-cell reactivity in relapsing-remitting multiple sclerosis: association with clinical and MRI activity.** J Neuroimmunol. 2002 May;126(1-2):143-60.

Hillert J, Kall T, Vrethem M, Fredrikson S, Ohlson M, Olerup O. **The HLA-Dw2 haplotype segregates closely with multiple sclerosis in multiplex families.** J Neuroimmunol. 1994 Feb;50(1):95-100.

Hilliard B, Wilmen A, Seidel C, Liu TS, Goke R, Chen Y. **Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis.** J Immunol. 2001 Jan 15;166(2):1314-9

Hohlfeld R, Wekerle H. **Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14599-606. Epub 2004 Aug 11.

Holz A, Schaeren-Wiemers N, Schaefer C, Pott U, Colello RJ, Schwab ME. **Molecular and developmental characterization of novel cDNAs of the myelin-associated/oligodendrocytic basic protein.** J Neurosci. 1996 Jan 15;16(2):467-77.

Holz A, Bielekova B, Martin R, Oldstone MB. **Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis.** J Immunol. 2000 Jan 15;164(2):1103-9.

Hong J, Zang YC, Li S, Rivera VM, Zhang JZ. **Ex vivo detection of myelin basic protein-reactive T cells in multiple sclerosis and controls using specific TCR oligonucleotide probes.** Eur J Immunol. 2004 Mar;34(3):870-81.

Igney FH, Krammer PH. **Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.** Nat Rev Cancer. 2002 Apr;2(4):277-88.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. **Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP**. Nature. 1997 Jul 10;388(6638):190-5

Issazadeh S, Abdallah K, Chitnis T et al. **Role of passive T-cell death in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis**. J Clin Invest. 2000 Apr;105(8):1109-16

Jersild C, Fog T, Hansen GS, Thomsen M, Svejgaard A, Dupont B. **Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course**. Lancet. 1973 Dec 1;2(7840):1221-5.

Kaser A, Deisenhammer F, Berger T, Tilg H. **Interferon-beta 1b augments activation-induced T-cell death in multiple sclerosis patients**. Lancet. 1999 Apr 24;353(9162):1413-4.

Kaye JF, Kerlero de Rosbo N, Mendel I et al. **The central nervous system-specific myelin oligodendrocytic basic protein (MOBP) is encephalitogenic and a potential target antigen in multiple sclerosis (MS)**. J Neuroimmunol. 2000 Jan 24;102(2):189-98.

Kerlero de Rosbo N, Hoffman M, Mendel I et al. **A. Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions**. Eur J Immunol. 1997 Nov;27(11):3059-69.

Kerlero de Rosbo NK, Kaye JF, Eisenstein M et al. **The myelin-associated oligodendrocytic basic protein region MOBP15-36 encompasses the immunodominant major encephalitogenic epitope(s) for SJL/J mice and predicted epitope(s) for multiple sclerosis-associated HLA-DRB1*1501**. J Immunol. 2004 Jul 15;173(2):1426-35.

Kern F, Sural IP, Brock C, Freistedt B et al. **T-cell epitope mapping by flow cytometry**. Nat Med. 1998 Aug;4(8):975-8.

Kern F, Faulhaber N, Frommel C et al. **Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides**. Eur J Immunol. 2000 Jun;30(6):1676-82.

Kieseier BC, Kiefer R, Clements JM et al. **Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis**. Brain. 1998 Jan;121 (Pt 1):159-66.

Klein L, Klugmann M, Nave KA, Tuohy VK, Kyewski B. **Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells.** Nat Med. 2000 Jan;6(1):56-61.

Kurtzke JF. **Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS).** Neurology. 1983 Nov;33(11):1444-52.

Kurtzke JF. **Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection.** Clin Microbiol Rev 1994 Jan;7(1):141.

Laman JD, Visser L, Maassen CB et al. **Novel monoclonal antibodies against proteolipid protein peptide 139-151 demonstrate demyelination and myelin uptake by macrophages in MS and marmoset EAE lesions.** J Neuroimmunol. 2001 Sep 3;119(1):124-30.

Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. **Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen.** Nature. 1992 Jul 9;358(6382):155-7.

Louis JC, Magal E, Takayama S, Varon S. **CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death.** Science. 1993 Jan 29;259(5095):689-92

Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. **Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination.** Ann Neurol 2000;47: 707-717

Lunemann JD, Aktas O, Gniadek P, Zschenderlein R, Zipp F. **Downregulation of transforming growth factor-beta1 in interferon-beta1a-treated MS patients.** Neurology. 2001 Sep 25;57(6):1132-4.

Macchi B, Matteucci C, Nocentini U, Caltagirone C, Mastino A. **Impaired apoptosis in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with multiple sclerosis.** Neuroreport. 1999 Feb 5;10(2):399-402.

Malipiero U, Frei K, Spanaus KS et al. **Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis is chronic/relapsing in perforin knockout mice, but monophasic in Fas- and Fas ligand-deficient lpr and gld mice.** Eur J Immunol. 1997 Dec;27(12):3151-60.

- Markovic-Plese S, Fukaura H, Zhang J et al. **T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans.** J Immunol. 1995 Jul 15;155(2):982-92.
- Martin R, Jaraquemada D, Flerlage M et al. **Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals.** J Immunol. 1990 Jul 15;145(2):540-8.
- Martin R, Sturzebecher CS, McFarland HF. **Immunotherapy of multiple sclerosis: where are we? Where should we go?** Nat Immunol 2001,2[9]: 785-788
- Martino G, Filippi M, Martinelli V, Brambilla E, Comi G, Grimaldi LM. **Clinical and radiologic correlates of a novel T lymphocyte gamma-interferon-activated Ca²⁺ influx in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis.** Neurology. 1996 May;46(5):1416-21.
- Mason D. **A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor.** Immunol Today. 1998 Sep;19(9):395-404.
- McDonald WI, Compston A, Edan G et al. **Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.** Ann Neurol. 2001 Jul;50(1):121-7.
- McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. **Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis.** Nat Med. 2005 Mar;11(3):335-9. Epub 2005 Feb 27.
- Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD et al. **International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial Group. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis.** N Engl J Med. 2003 Jan 2;348(1):15-23.
- Nagata S. **Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model.** J Hum Genet. 1998;43(1):2-8.
- Nave KA, Lai C, Bloom FE, Milner RJ. **Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM-20 protein of central nervous system myelin.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Aug;84(16):5665-9.
- Navikas V, Link H. **Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis.** J Neurosci Res. 1996 Aug 15;45(4):322-33.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. **A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.** J Immunol Methods. 1991 Jun 3;139(2):271-9.

Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, Zipp F. **Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL).** Lancet. 2000 Sep 2;356(9232):827-8

Oksenberg JR, Stuart S, Begovich AB et al. **Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V alpha transcripts in brains of multiple sclerosis patients.** Nature. 1991 Sep 5;353(6339):94.

Okuda Y, Okuda M, Apatoff BR, Posnett DN. **The activation of memory CD4(+) T cells and CD8(+) T cells in patients with multiple sclerosis.** J Neurol Sci. 2005 Aug 15;235(1-2):11-7.

Olsson T, Sun J, Hillert J et al. **Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis.** Eur J Immunol. 1992 Apr;22(4):1083-7.

Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA. **T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis.** Nature. 1990 Jul 12;346(6280):183-7.

Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. **Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon.** Lancet. 1987 Apr 18;1(8538):893-5

Pelfrey CM, Trotter JL, Tranquill LR, McFarland HF. **Identification of a novel T cell epitope of human proteolipid protein (residues 40-60) recognized by proliferative and cytolytic CD4+ T cells from multiple sclerosis patients.** J Neuroimmunol. 1993 Jul;46(1-2):33-42.

Pelfrey CM, Rudick RA, Coteur AC, Lee JC, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. **Quantification of self-recognition in multiple sclerosis by single-cell analysis of cytokine production.** J Immunol. 2000 Aug 1;165(3):1641-51.

Pender MP. **Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of multiple sclerosis.** Lancet. 1998 Mar 28;351(9107):978-81. Review.

Pender MP, Csurhes PA, Greer JM et al. **Surges of increased T cell reactivity to an encephalitogenic region of myelin proteolipid protein occur more often in patients with multiple sclerosis than in healthy subjects.** J Immunol. 2000 Nov 1;165(9):5322-31.

Petelin Z, Brinar V, Petravic D, Zurak N, Dubravcic K, Batinic D. **CD95/Fas expression on peripheral blood T lymphocytes in patients with multiple sclerosis: effect of high-dose methylprednisolone therapy.** Clin Neurol Neurosurg. 2004 Jun;106(3):259-62.

Pribyl TM, Campagnoni C, Kampf K, Handley VW, Campagnoni AT. **The major myelin protein genes are expressed in the human thymus.** J Neurosci Res. 1996 Sep 15;45(6):812-9.

Quandt JA, Baig M, Yao K, Kawamura K et al. **Unique clinical and pathological features in HLA-DRB1*0401-restricted MBP 111-129-specific humanized TCR transgenic mice.** J Exp Med. 2004 Jul 19;200(2):223-34.

Rieckmann P, Toyka KV, Bassetti C et al. **Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group. Escalating immunotherapy of multiple sclerosis--new aspects and practical application.** J Neurol. 2004 Nov;251(11):1329-39.

Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C et al. **Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity.** Science. 1995 Jun 2;268(5215):1347-9.

Sabelko-Downes KA, Cross AH, Russell JH. **Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis.** J Exp Med. 1999 Apr 19;189(8):1195-205.

Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP et al. **A population-based study of multiple sclerosis in twins: update.** Ann Neurol. 1993 Mar;33(3):281-5.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A et al. **Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.** EMBO J. 1998 Mar 16;17(6):1675-87.

Schmied M, Breitschopf H, Gold R et al. **Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain.** Am J Pathol. 1993 Aug;143(2):446-52.

Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. **Overexpression of the apoptosis inhibitor FLIP in T cells correlates with disease activity in multiple sclerosis.** J Neuroimmunol. 2001 Feb 15;113(2):268-74.

Sharief MK. **Impaired Fas-independent apoptosis of T lymphocytes in patients with multiple sclerosis.** J Neuroimmunol. 2000 Sep 22;109(2):236-43.

Sharief MK, Semra YK, Seidi OA, Zoukos Y. **Interferon-beta therapy downregulates the anti-apoptosis protein FLIP in T cells from patients with multiple sclerosis.** J Neuroimmunol. 2001 Nov 1;120(1-2):199-207.

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

Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. **Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages.** J Neuroimmunol. 1983 Jun;4(3):201-21.

Trauth BC, Klas C, Peters AM et al. **Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.** Science. 1989 Jul 21;245(4915):301-5.

Trotter JL, Pelfrey CM, Trotter AL et al. **T cell recognition of myelin proteolipid protein and myelin proteolipid protein peptides in the peripheral blood of multiple sclerosis and control subjects.** J Neuroimmunol. 1998 Apr 15;84(2):172-8.

Tuohy VK, Yu M, Weinstock-Guttman B, Kinkel RP. **Diversity and plasticity of self recognition during the development of multiple sclerosis.** J Clin Invest. 1997 Apr 1;99(7):1682-90.

Tuohy VK, Yu M, Yin L, Kawczak JA, Kinkel RP. **Spontaneous regression of primary autoreactivity during chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis.** J Exp Med. 1999 Apr 5;189(7):1033-42.

Van der Aa A, Hellings N, Bernard CC, Raus J, Stinissen P. **Functional properties of myelin oligodendrocyte glycoprotein-reactive T cells in multiple sclerosis patients and controls.** J Neuroimmunol. 2003 Apr;137(1-2):164-76

Vanderlugt CL, Neville KL, Nikcevich KM et al. **Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoepitopes in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis.** J Immunol. 2000 Jan 15;164(2):670-8.

Vella A, Teague TK, Ihle J, Kappler J, Marrack P. **Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4.** J Exp Med. 1997 Jul 21;186(2):325-30.

Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P. **Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 31;95(7):3810-5.

Waiczies S, Weber A, Lunemann JD, Aktas O, Zschenderlein R, Zipp F. **Elevated Bcl-X(L) levels correlate with T cell survival in multiple sclerosis.** J Neuroimmunol. 2002 May;126(1-2):213-20.

Wallstrom E, Khademi M, Andersson M, Weissert R, Linington C, Olsson T. **Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15)+ multiple sclerosis.** Eur J Immunol. 1998 Oct;28(10):3329-35.

Weinshenker BG. **Epidemiology of multiple sclerosis.** Neurol Clin. 1996 May;14(2):291-308.

Weinshenker BG, Santrach P, Bissonet AS et al. **Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS: a population-based study.** Neurology. 1998 Sep;51(3):742-7.

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ et al. **Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.** Immunity. 1995 Dec;3(6):673-82.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. **Cell death: the significance of apoptosis.** Int Rev Cytol 1980, 68:251-306

Wucherpfennig KW, Zhang J, Witek C et al. **Clonal expansion and persistence of human T cells specific for an immunodominant myelin basic protein peptide.** J Immunol. 1994 Jun 1;152(11):5581-92.

Wucherpfennig KW, Strominger JL. **Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein.** Cell. 1995 Mar 10;80(5):695-705.

Yamamoto Y, Mizuno R, Nishimura T et al. **Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein. A novel basic protein constituting the central nervous system myelin.** J Biol Chem. 1994 Dec 16;269(50):31725-30.

Yang E, Korsmeyer SJ. **Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death.** Blood. 1996 Jul 15;88(2):386-401.

Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. **A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.** J Exp Med. 1989 May 1;169(5):1747-56.

Zang YC, Kozovska MM, Hong J et al. **Impaired apoptotic deletion of myelin basic protein-reactive T cells in patients with multiple sclerosis.** Eur J Immunol. 1999 May;29(5):1692-700.

Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA. **Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis.** J Exp Med. 1994 Mar 1;179(3):973-84.

Zipp F, Weller M, Calabresi PA et al. **Increased serum levels of soluble CD95 (APO-1/Fas) in relapsing-remitting multiple sclerosis.** Ann Neurol. 1998a Jan;43(1):116-20

Zipp F, Otzelberger K, Dichgans J, Martin R, Weller M. **Serum CD95 of relapsing remitting multiple sclerosis patients protects from CD95-mediated apoptosis.** J Neuroimmunol. 1998b Jun 15;86(2):151-4

Zipp F, Beyer M, Gelderblom H, Wernet D, Zschenderlein R, Weller M. **No induction of apoptosis by IFN-beta in human antigen-specific T cells.** Neurology. 2000 Jan 25;54(2):485-7.

Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

Publikationsliste

Weber A, Infante-Duarte C, Sawcer S, Setakis E, Bellmann-Strobl J, Hensiek A, **Rueckert S**, Schoenemann C, Benediktsson K, Compston A, Zipp F. A genome-wide German screen for linkage disequilibrium in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003 Oct;143(1-2):79-83

Lunemann JD* and **Rueckert S***, Kern F, Wendling U, van der Zee R, Volk HD, Zipp F. Cross-sectional and longitudinal analysis of myelin-reactive T cells in patients with multiple sclerosis. *J Neurol.* 2004 Sep;251(9):1111-20 (*equally contributed)

Bauerfeind I und **Rueckert S**. Krebs im gebärfähigen Alter (Schwangerschaft nach Brustkrebs, Gebärmutterhalskrebs). *Deutsche Hebammen Zeitschrift* 2004 (6)

Rühl I und **Rueckert S**, Kahlert S, Untch M. Neoadjuvante Chemotherapie bei Mammakarzinom. *Journal Onkologie (Sonderheft)* September 2004

Lenhard M, Kahlert S, **Rueckert S**, Untch M, Bauerfeind I. Mammakarzinom und Schwangerschaft. Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms-State of the Art 2004. Herausgeber Untch, Sittek, Bauerfeind, Reiser, Hepp. Zuckschwerdt Verlag

Rueckert S, Mosner M, Ditsch et al. PO-O27.4 Die TECHNO-Studie (Taxol-Epirubicin-Cyclophosphamid-Herceptin-Neoadjuvant) ein Herceptinhaltiges präoperatives Studienkonzept der AGO. Poster DGCG 2004

Rueckert S, Harder M, Untch M. Lymphödem. Buchbeitrag *Gynäkologische Onkologie*. Herausgeber Petru, Jonat, Fink, Köchli, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2005

Rueckert S, Ruehl I, Kahlert S, Konecny G, Untch M. A monoclonal antibody as an effective therapeutic agent in breast cancer: trastuzumab. *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Jun;5(6):853-66

Rueckert S. Physiologische Veränderungen; Beratung zur Lebensführung; Röntgendiagnostik in der Schwangerschaft. Buchbeiträge *Geburtshilfe Basics*. Herausgeber Strauss. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006

Lenhard MS, Johnson TR, Himsl I, Ditsch N, **Rueckert S**, Friese K, Untch M. Obstetrical and gynecological writing and publishing in Europe. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2006 Dec;129(2):119-23

Rueckert S, Wirtz R, Lenhard M et al. Response prediction in neoadjuvant trastuzumab treated HER-2/neu-positive breast cancer by quantitative RT-PCR analysis of FFPE tissue. SABCS 2006

Rückert S, Lenhard MR, Hasmüller S, Kahlert S, Friese K, Bauerfeind I. 29th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium 2006 - Neuigkeiten zur Therapie des Mammakarzinoms. Der Gynäkologe. Heft 4 April 2007, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007

Rückert S und Bauerfeind I. Das lokoregionäre Rezidiv. Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms-State of the Art 2007. Herausgeber Untch, Sittek. Zuckschwerdt Verlag (im Druck)

Rueckert S, Wirtz R, Lenhard M et al. Microtubule-associated protein tau is a marker of pathological complete response in Her-2/neu positive neoadjuvant treated breast cancer patients. SABCS 2007 (akzeptiert)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Fauke Zipp für die Ermöglichung der Arbeit und der Überlassung des Themas.

Weiter möchte ich den Mitarbeitern der Cecilie-Vogt-Klinik für Molekulare Neurologie unter der Leitung von Frau Prof. Zipp für die gute Kooperation und Unterstützung danken.

Mein Dank gilt meinem jetzigen Chef Herrn Prof. Klaus Friese für die kontinuierliche Motivation, die Arbeit doch endlich zu einem Abschluss zu bringen, sowie seinen Mitarbeitern. Eure Motivation und aufmunternden Worte haben mir in vielen schwierigen Phasen geholfen!

Mein besonderer Dank gilt Anja, Nina und Michi, die mir bei der Korrektur und Formatierung der Doktorarbeit geholfen haben.

Claudi, Micku, Moni, Anja - Danke für eure Unterstützung.

Wolfgang - Danke für alles, insbesondere deine Geduld. Auf dass mir die Promotion nie wieder die Laune verdirbt!

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium der Humanmedizin und die Promotion ermöglicht haben. (Mama, ich hab`s doch geschafft!)

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Sandra Rückert, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Ex-vivo Detektion und Quantifizierung autoreaktiver T-Zellen bei MS-Patienten und Kontrollen

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Sandra Rückert