

Aus dem Institut für Neuroimmunologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Analyse der Expression von Todesliganden und der  
Gewebeschädigung im zentralen Nervensystem in  
einem Tiermodell der Multiplen Sklerose**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Susanne Meier  
aus Bernau

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

2. Prof. Dr. med. Norbert Goebels

3. Prof. Dr. med. Norbert Sommer

Datum der Promotion: 23.06.06

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Die multiple Sklerose</b>	<b>1</b>
1.1.1. Einführung und epidemiologische Daten	1
1.1.2. Ätiologie der Multiplen Sklerose	1
1.1.3. Pathologie der Multiplen Sklerose	2
1.1.2. Klinische Präsentation und typische Verlaufsformen der MS	4
<b>1.2. Die EAE als Tiermodell der MS</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Apoptose</b>	<b>8</b>
1.3.1. Allgemeine Funktionen der Apoptose	8
1.3.1. Die Rolle der Apoptose bei der Multiplen Sklerose und im Rahmen der EAE	8
<i>1.3.1.1. Apoptose autoreaktiver Zellen</i>	8
<i>1.3.1.1. Apoptose als Effektormechanismus</i>	9
<b>1.4. Apoptoseassoziierte Faktoren</b>	<b>9</b>
1.4.1. Das Tumor Nekrose Faktor (TNF) System	9
1.4.2. Das CD95/CD95-Ligand System	10
<i>1.4.2.1. Rolle des CD95-Systems in der EAE</i>	11
1.4.3. TRAIL-Rezeptor/TRAIL	13
<i>1.4.3.1. Rolle des TRAIL-Systems in der EAE</i>	14
<b>2. Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>3. Materialien und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1. Aufbau des Experiments und Versuchstiere	18
3.1.1. Versuchstierhaltung	18
3.1.2. Aufbau des Experiments	18
<b>3.2. Immunisierung</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Untersuchung der Mäuse</b>	<b>19</b>
<b>3.4. Perfusionsschema</b>	<b>20</b>
<b>3.5. Narkose und Perfusion der Tiere</b>	<b>22</b>
3.5.1. Perfusion und Organentnahme für PCR-Messungen	22

3.5.2. Perfusion und Organentnahme für histologische Aufarbeitung	22
<b>3.6. Gesamt-RNA-Isolation</b>	<b>23</b>
<b>3.7. Reverse Transkription</b>	<b>24</b>
<b>3.8. Theoretische Grundlagen der Taqman-PCR</b>	<b>25</b>
3.8.1. Entwicklung der real-time-PCR	25
3.8.2. Grundlagen der Funktionsweise der real-time-PCR	25
3.8.3. Auswertung der real-time-PCR	27
<b>3.9. Praktische Durchführung der Taqman PCR</b>	<b>30</b>
3.9.1. Eingesetzte Gewebeproben und definierte Zielgene	30
3.9.2. Primerdesign	30
3.9.3. Sondendesign	31
3.9.4. Kontrolle der Primer und Sonden	32
3.9.5. Durchführung der Real-Time TaqMan PCR	32
3.9.6. Quantifizierung mittels TaqMan-Technologie	33
<b>3.10. Statistische Auswertung</b>	<b>34</b>
<b>3.11. Histologische Aufarbeitung</b>	<b>34</b>
3.11.1. Anfertigen von Vibratomschnitten	34
3.11.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Quantifizierung	34
3.11.3. Klüver-Barrera-Färbung und Quantifizierung	35
<b>3.12. Immunhistochemie</b>	<b>36</b>
3.12.1. Aktivierte-Caspase 3-Färbung	37
3.12.2. APP-Färbung	38
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
4.1. Krankheitsverlauf der EAE	40
4.2. Entwicklung des Körpergewichts im Krankheitsverlauf	42
<b>4.3. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen</b>	<b>43</b>
4.3.1. Ausprägung der Inflammation im ZNS	45
4.3.2. Ausprägung der neuronalen Apoptose im ZNS	48

4.3.3. Ausprägung des axonalen Schadens im ZNS	50
4.3.4. Ausprägung der Demyelinisierung im ZNS	52
<b>4.3.2. Übersichtstabelle histologische Parameter</b>	<b>54</b>
<b>4.4. Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen</b>	<b>55</b>
4.4.1. TRAIL-Expression bei erkrankten und Kontrolltieren	55
4.4.1.1. Hochregulation der TRAIL-Expression im ZNS	55
4.4.1.2. Hochregulation der TRAIL-Expression in der Milz	56
4.4.2. DR5-Expression bei erkrankten und Kontrolltieren	57
4.4.2.1. Frühe Hochregulation der DR5-Expression im ZNS	57
4.4.2.1. DR5 Expression in der Milz herunterreguliert	58
4.4.3. CD95-Expression bei erkrankten und Kontrolltieren	59
4.4.3.1. Hochregulation der CD95-Expression im ZNS	59
4.4.3.2. Hochregulation der CD95-Expression in der Milz	60
4.4.4. CD95-Ligand-Expression bei erkrankten und Kontrolltieren	61
4.4.4.1. Hochregulation der CD95-Ligand-Expression im ZNS	61
4.4.4.2. Hochregulation der CD95-Ligand-Expression in der Milz	62
<b>4.4.5. Übersichtstabelle Expressionsdaten</b>	<b>64</b>
<b>5. Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>5.1. Ursachen der funktionellen Einschränkungen in der EAE</b>	<b>65</b>
5.1.1. Inflammation	65
5.1.2. Axonaler Schaden	66
5.1.4. Demyelinisierung	68
5.1.5. Neuronale Apoptose	68
<b>5.2. Expression von Todesliganden und Rezeptoren in ZNS und Milz in der EAE</b>	<b>70</b>
5.2.1. Bedingt die festgestellte Änderung der CD95-Expression im ZNS die Suszeptibilität gegenüber EAE?	70
5.2.2. Welche Rolle spielt der CD95-Ligand für die Remission?	71
5.2.3. Duale Rolle von TRAIL in der EAE Pathogenese	72
5.2.4. Ist die Expressionsänderung von DR5 der Schlüssel für die Suszeptibilität gegenüber TRAIL?	74

<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>93</b>
<b>8.1. Verzeichnis gängiger Abkürzungen</b>	<b>93</b>
<b>8.2. Verwendete Geräte und Materialien</b>	<b>95</b>
Geräte und Materialien	95
Primers und Probes	97
<b>8.3. Danksagung</b>	<b>98</b>
<b>8.4. Lebenslauf</b>	<b>99</b>
<b>8.7. Publikationen</b>	<b>100</b>
<b>8.7. Erklärung</b>	<b>101</b>



## Abstract

Die EAE ist ein anerkanntes tierexperimentelles Paradigma der Multiplen Sklerose. Nach subkutaner Immunisierung mit einem Myelinantigen oder Transfer myelinspezifischer T-Zellen, entwickeln susceptible Spezies eine demyelinisierende Entzündung des ZNS mit klinisch gut graduierbaren neurologischen Defiziten. Der Apoptose wird eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der EAE zugeschrieben, sie hat einerseits eine wichtige physiologische Funktion bei der Regulation des Immunsystems, spielt aber auch eine wesentliche Rolle als Schadensmechanismus aktivierter Immunzellen. und kann z.B. durch Interaktion eines Apoptose-induzierenden Rezeptors mit seinem Liganden ausgelöst werden. In der vorliegenden Arbeit wurden das TRAIL- und das CD95-System aus TNF/NGF-Superfamilie genauer untersucht. Dazu wurden in verschiedenen EAE-Erkrankungsstadien und in unterschiedlichen Regionen des ZNS die Expressionsänderungen apoptoseassoziiierter Faktoren mittels real-time RT-PCR analysiert und mit der Milz als peripherem Immunorgan verglichen. Die Expressionsänderungen wurden mit dem klinischen Verlauf und ausgewählten histologischen Parametern, namentlich Inflammation, axonaler Schaden, Demyelinisierung und neuronale Apoptose korreliert. Nach den vorliegenden Daten lassen sich Theorien, nach denen es zuerst zu Demyelinisierung, dann sekundär als Langzeitfolge zu axonalem Schaden und erst als Folge dessen zu einem Untergang von Neuronen kommt nicht halten. In dem verwendeten Paradigma findet axonaler Schaden und neuronale Apoptose parallel zueinander, bereits vor der Demyelinisierung statt. Das ist ein Hinweis dafür, dass sowohl Axon als auch Neuron ein primäres Angriffsziel sein könnten und axonaler Schaden sowie neuronale Apoptose allein stehende Schadensmechanismen sind. Bei der Auswertung der Expressionsdaten der Apoptose-Systeme wurde festgestellt, dass die Expressionsänderungen vor allem im Rückenmark und Hirnstamm stattfinden und andere ZNS-Regionen so gut wie nicht betroffen waren. Die TRAIL-Expression im ZNS und in der Milz wurde hochreguliert, wohingegen die Expression des TRAIL-Rezeptors DR5 nur im ZNS anstieg, peripher hingegen sogar sank. Eine sehr wichtige neue Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass DR5 im gesunden ZNS nur auf sehr niedrigem Niveau exprimiert wird, die Expression steigt aber bereits vor Symptombeginn und eher als die aller anderen untersuchten Faktoren auf ein Vielfaches an. Bekannt ist, dass DR5 im ZNS vor allem auf Neuronen und Oligodendrozyten exprimiert wird. Durch die frühe Hochregulation von DR5 ist der Weg für TRAIL-induzierten Gewebeschaden gebahnt. Im inflammatorisch veränderten Gewebe scheint also die Empfindlichkeit für TRAIL induzierten Zellschaden gesteigert zu sein.

