

4. Ergebnisse

4.1. Krankheitsverlauf der EAE

Die immunisierten Tiere und auch die Gruppe der scheinimmunisierten Tiere wurden jeden Tag klinisch untersucht. Die scheinimmunisierten Tiere werden nachfolgend vereinfacht als Kontrollgruppe bezeichnet. Naive, unbehandelte Kontrollen werden gesondert als solche bezeichnet. Der Grad der motorischen und koordinativen Einschränkung wurde standardisiert erfasst und in Form des sogenannten Scorewertes ausgedrückt.

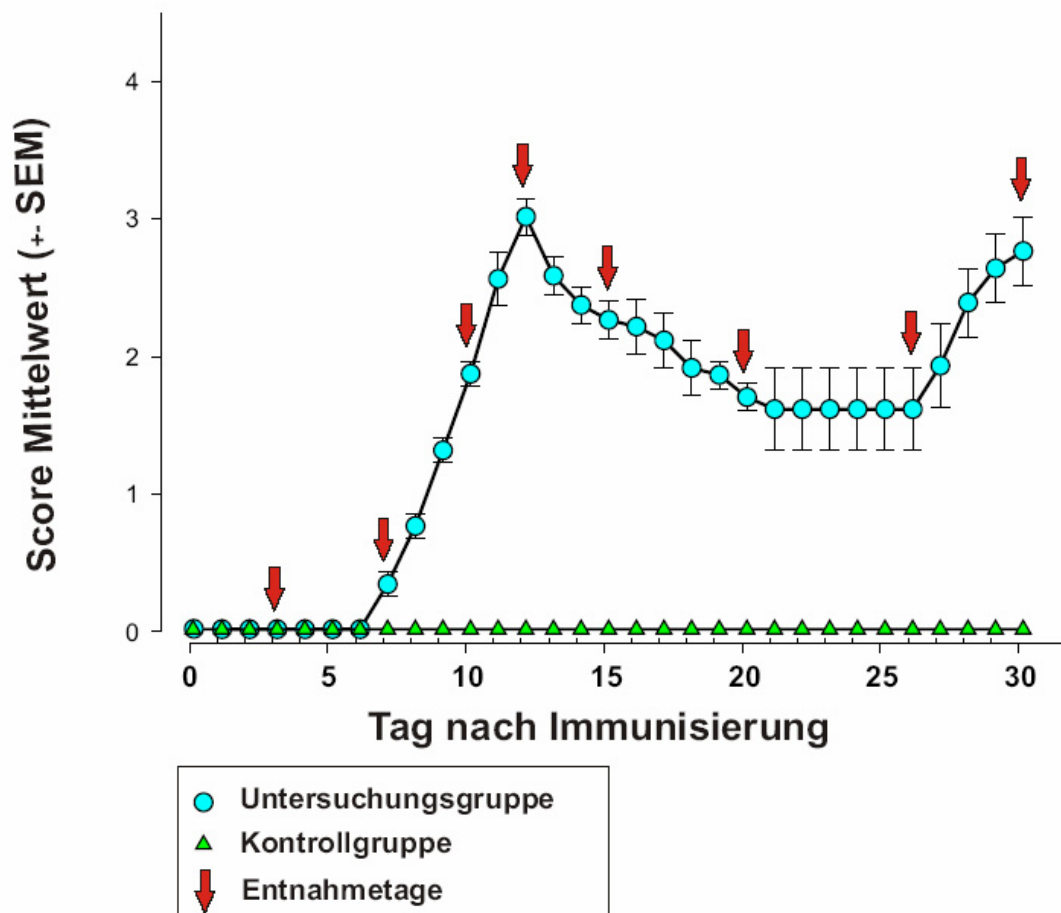


Abbildung 9: Darstellung der durchschnittlichen Scorewerte an den einzelnen Tagen. Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Anhand der klinischen Daten lässt sich die Krankheitsentwicklung in fünf Phasen einteilen, die als Grundlage für die Genexpressionsstudien und die histologischen Untersuchungen dienen. In der präklinischen Phase, die von Tag 0 bis Tag 6 andauerte, waren alle Tiere frei von klinisch feststellbaren Krankheitserscheinungen (Score 0). Der Zeitraum von Tag 7 bis Tag 9 wurde als Krankheitsbeginn bezeichnet. Am Tag 7 zeigte mehr als die Hälfte der Mäuse beginnende

Symptome in Form einer Schwanzlähmung, bis zum Tag 9 waren dann alle Tiere der Untersuchungsgruppe erkrankt. Der Erkrankungshöhepunkt des ersten Schubs wurde am Tag 12 erreicht. Der Durchschnittsscore (Mittelwert) an diesem Tag betrug 3, d.h. die meisten Tiere entwickelten eine Plegie der Hinterbeine mit einer Parese der Vorderbeine. Dabei ist in Betracht zu ziehen, dass Tiere, die an der EAE verstarben, nicht in die Berechnung des Durchschnittsscores einbezogen wurden. Der Tag 15 wurde als Startpunkt für die Remissionsphase angesehen, da an diesem Tag bei allen Tieren der Gruppe ein deutlicher Rückgang des Scorewertes zu verzeichnen war. Die Mehrzahl der Tiere hatte zu diesem Zeitpunkt noch eine Parese in den Hinterbeinen, jedoch keine Lähmungen in den Vorderbeinen mehr, was dem Durchschnittsscore von 2 entspricht. Die Remissionsphase dauerte bis zum Tag 26 an, der Durchschnittsscore betrug in dieser Phase 1,5. Das bedeutet, dass kein vollständiger Rückgang der Behinderung zu verzeichnen war, denn ausnahmslos alle Tiere hatten weiterhin eine Parese des Schwanzes und mehr als die Hälfte der Tiere zeigte weiterhin eine Störung des „Righting-Reflexes“. Ab Tag 27 war ein erneuter Anstieg des Scorewertes zu verzeichnen, der erneute Schub begann bei dem Großteil der Tiere mit erneuten Paresen der Hinterbeine. Am Tag 29 waren dann alle Tiere eindeutig in der Phase des Rückfalls, in welchem die Scorewerte ähnlich hoch wie während des Höhepunktes des ersten Schubs waren. Die Tiere waren von einer Plegie der Hinterbeine, einige Tiere auch von Paresen der Vorderbeine betroffen. Im Gesamtbild ist dieser Verlauf als schubförmig-remittierend zu bezeichnen, da auf einen akuten Schub und die anschließende Phase der Erholung ein erneuter Schub folgte. In der Tabelle 4 ist die aufgrund des klinischen Verlaufes erfolgte Zusammenfassung in Gruppen für die Auswertung der Genexpressionsstudien und die histologische Auswertung dargestellt.

Tabelle 4 Zusammenfassung der Entnahmezeitpunkte nach Einteilung des Verlaufes in klinische Stadien:

Stadieneinteilung	Entnahmetage	Anzahl der Mäuse, die für die Auswertung zusammengefasst wurden (nur kranke Mäuse)
Präklinische Phase	Tag 0 und Tag 3 nach Immunisierung	8 (je 4 für Expressions und histologische Untersuchungen)
Krankheitsbeginn	Tag 7 und Tag 9 nach Immunisierung	8 (je 4 für Expressions und histologische Untersuchungen)
Erkrankungsgipfel	Tag 12 nach Immunisierung	6 (je 4 für Expressions und histologische Untersuchungen)
Remissionsphase	Tag 15 und Tag 20 nach Immunisierung	8 (je 4 für Expressions und histologische Untersuchungen)
Rückfall	Tag 30 und Tag 27 nach Immunisierung	8 (je 4 für Expressions und histologische Untersuchungen)

4.2. Entwicklung des Körpergewichts im Krankheitsverlauf

Das Körpergewicht der Tiere wurde jeden Tag erfasst.

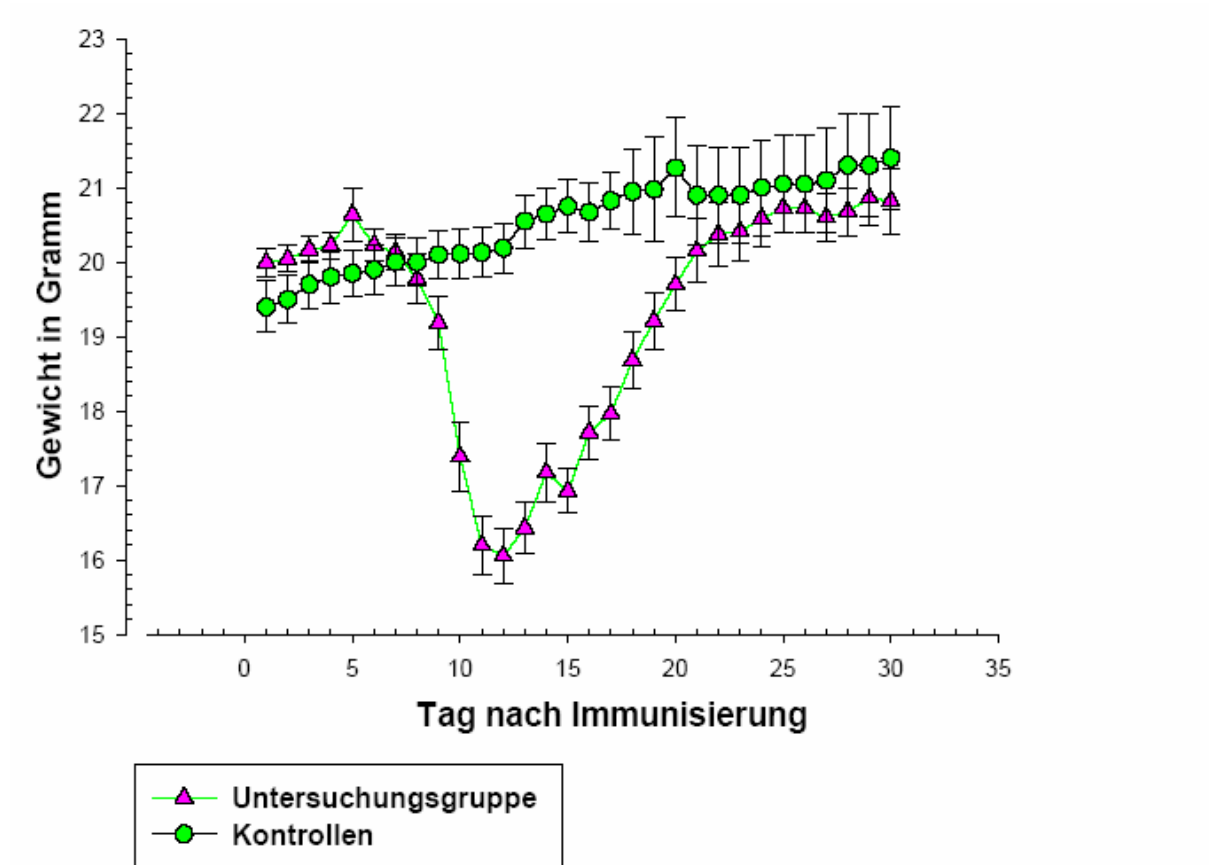


Abbildung 10: graphischer Vergleich des durchschnittlichen Körpergewichts in der Kontroll- und Untersuchungsgruppe während des Beobachtungszeitraumes. Der Standardfehler des Mittelwertes ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Aus Abbildung 10 ist ersichtlich, dass das durchschnittliche Körpergewicht in beiden Gruppen zu Beginn der Untersuchung fast gleich war. In den folgenden Tagen erfolgte in beiden Gruppen eine leichte Gewichtszunahme. Das Durchschnittsgewicht (Mittelwert) der Untersuchungsgruppe begann bereits ab Tag 5, also 2 Tage vor Einsetzen der klinischen Symptome abzunehmen. In der Phase des Krankheitsbeginns zwischen Tag 7 bis 9 betrug der durchschnittliche Gewichtsverlust in der Untersuchungsgruppe 0,9 Gramm ($1/20$ des Körpergewichtes). In dieser Phase betrug der Scorewert 0,5-1,5 Punkte. Das bedeutet, dass in dieser frühen Phase nur ein geringer Behinderungsgrad bestand.

Von Tag 10 bis Tag 12 trat ein massiver Gewichtsverlust von noch einmal durchschnittlich 3 Gramm (Mittelwert) auf. In dieser Phase litten die meisten Tiere an schweren motorischen Einschränkungen bis hin zur Tetraplegie. Insgesamt verloren die Tiere während des ersten

Schubs 4 Gramm Gewicht, das entspricht 1/5 des Körpergewichtes. In der sich dem ersten Schub anschließenden Erholungsphase erfolgte eine schnelle Gewichtszunahme, und bereits am Tag 20 war das Ausgangsgewicht in der Untersuchungsgruppe wieder erreicht. Während dieser Erholungsphase hatten die Tiere Scorewerte zwischen 1,5 und 2.

In der Phase des Rückfalls traten zwar erneut schwere motorische Einschränkungen der Tiere auf, allerdings ließ sich kein erneuter Gewichtsverlust feststellen.

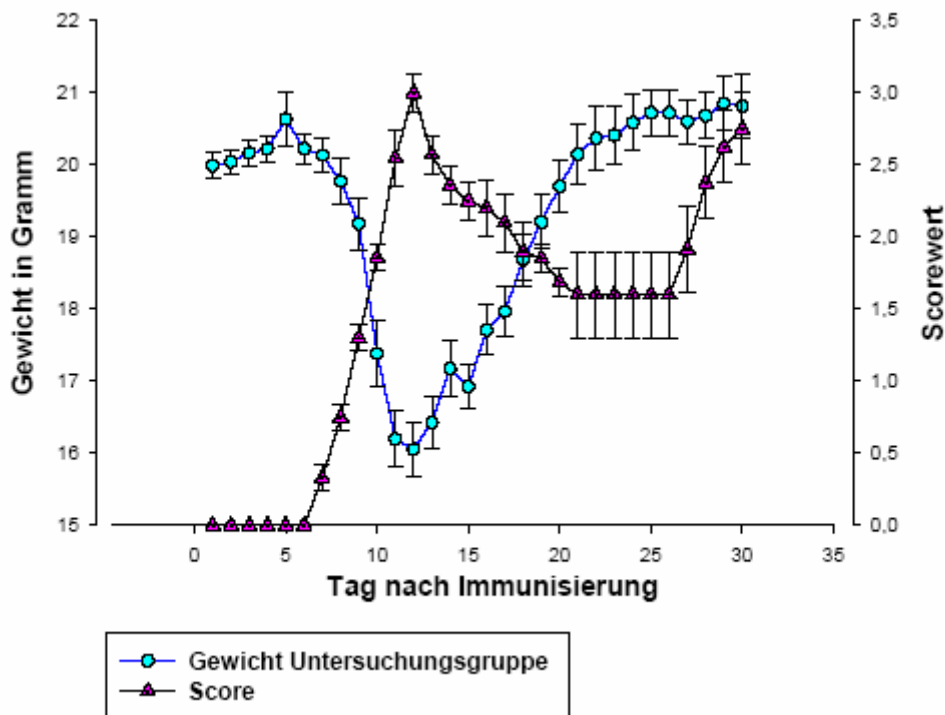


Abbildung 11: Entwicklung der Durchschnittsgewichte der an EAE erkrankten Tiere im Vergleich zum Krankheitsverlauf. Der Standardfehler des Mittelwertes ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

4.3. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

In der Auswertung wurden die neun Entnahmetage und ihre Ergebnisse fünf klinisch festgestellten Phasen zugeteilt (Tabelle 4). Die Werte für die Kontrollgruppe wurden für die graphische Darstellung gemittelt und unter dem Begriff Kontrollgruppe zusammengefasst, da sich die Expression bei den Kontrollen im Rückenmark, Hirnstamm und Frontalhirn für keines der untersuchten Gene unterschied. Die histologischen Befunde wurden differenziert nach ZNS-Region in mindestens vier verschiedenen Arealen an jeweils drei unterschiedlichen Schnittebenen ausgezählt. Da für jeden Zeitpunkt mindestens drei Tiere für die Untersuchung zur Verfügung standen, sind die dargestellten Werte aus wenigstens 24 Arealen, jeweils im

Hirnstamm, Rückenmark und Frontalhirn gewonnen. Die Tiere der Untersuchungsgruppe wurden mit den korrespondierenden gesunden Tieren der Kontrollgruppe verglichen. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde jedes Gen (getrennt nach Gewebe und Krankheitsstadium) mit der entsprechenden Kontrolle verglichen. In den Graphiken sind die p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests als Sternchen über den Fehlerbalken dargestellt. Die gewonnenen Daten sind ebenfalls in einer Übersichtstabelle am Ende des Kapitels 4.3. für alle Parameter und Regionen noch einmal zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 5 Darstellung des p-Wertes als Sternchen und ihre Entsprechung:

*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$

4.3.1. Ausprägung der Inflammation im ZNS

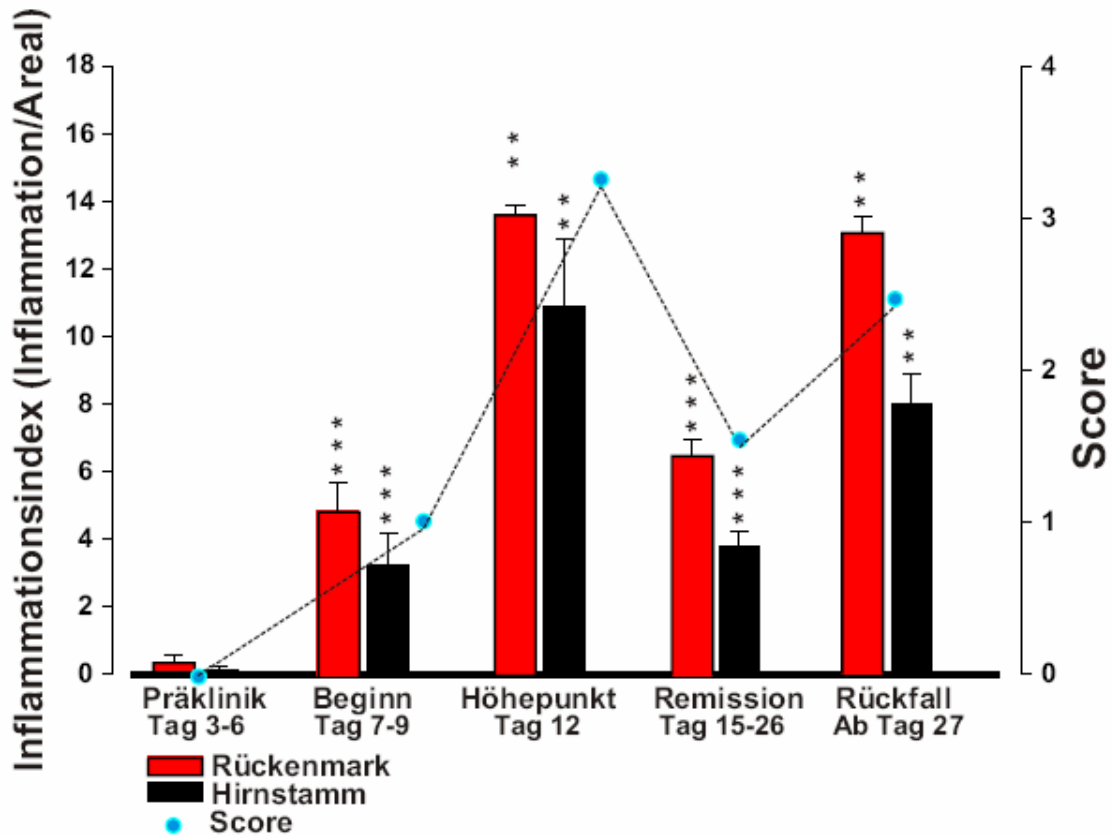


Abbildung 12: Stärke der Inflammation in den einzelnen ZNS Arealen. Der Inflammationsindex ist ein Maß für die Anzahl und Größe der Läsionen pro Areal, als Fehlerbalken ist der Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE Gruppe dar. In der nicht dargestellten Kontrollgruppe und im Frontalhirn der Untersuchungsgruppe war zu keinem Zeitpunkt Inflammation zu finden.

Tabelle 6 Stärke der parameningeale Infiltration in den verschiedenen Stadien und ZNS Regionen:

(+ leichte, ++ mittelstarke, +++ starke, ++++ sehr starke Infiltration)

Stadium	Hirnstamm	Rückenmark
Prälinik		
Beginn	+	+
Höhepunkt	+++	++++
Remission	+(+)	+(+)
Rückfall	++	+++

Da in keiner Region der Kontrollgruppe sowie auch im Frontalhirn der Untersuchungsgruppe zu keinem Zeitpunkt Inflammation zu detektieren war, sind diese Daten aufgrund der besseren

Übersichtlichkeit nicht graphisch mit dargestellt. Die parameningeale Infiltration floss nicht mit in diese Bewertung ein, sie wird gesondert in Tabelle 6 dargestellt.

Zum nicht dargestellten Zeitpunkt 0 (am Tag der Immunisierung) war in keinem ZNS-Areal Inflammation zu detektieren. Bereits in der klinisch asymptomatischen Phase waren im Hirnstamm und im Rückenmark entzündliche Infiltrate zu detektieren, dabei war die Inflammation im Rückenmark doppelt so stark wie im Hirnstamm. Die Meningen waren zu diesem Zeitpunkt noch frei von sichtbaren Infiltraten. Mit Beginn der Symptome war auch im Hirnstamm und Rückenmark ein massiver Anstieg der Infiltration zu finden. Im Vergleich zur präklinischen Phase stieg der Inflammationsindex im Hirnstamm um den Faktor 20 und im Rückenmark nochmals um den Faktor zwölf. Die Inflammation im Hirnstamm betrug zwei Drittel der Inflammation im Rückenmark. In beiden Regionen war eine leichte Infiltration der Meningen festzustellen. Die Entzündung erreichte ihren Höhepunkt im Hirnstamm und Rückenmark während des Erkrankungsgipfels, der Inflammationsindex verdreifachte sich in beiden Regionen im Gegensatz zur vorangegangenen Phase des Krankheitsbeginns. Die Inflammation im Hirnstamm war ca. 20 Prozent geringer ausgeprägt als die im Rückenmark. Im Gegensatz zur präklinischen Phase war die Stärke der Inflammation um den Faktor 60 im Hirnstamm und den Faktor 34 im Rückenmark erhöht, die Infiltration der Meningen war in beiden Regionen sehr stark. Während der Remissionsphase ging die Inflammation im Rückenmark und Hirnstamm etwas zurück, auch die meningeale Infiltration war rückläufig. Im Gegensatz zu gesunden Kontrollen waren diese Werte aber immer noch stark erhöht. Mit Beginn des zweiten Schubs stieg der Inflammationsindex im Rückenmark und Hirnstamm wieder an. Die Inflammation im Hirnstamm erreichte in dieser Phase zwei Drittel des Wertes der Inflammation im Rückenmark. Im Rückenmark wurde der Wert des ersten Schubes wieder fast erreicht. Im Hirnstamm war die Inflammation im Vergleich zur präklinischen Phase um den Faktor 44 erhöht. Die meningeale Infiltration im Hirnstamm und Rückenmark während des Rückfalls war als stark zu bewerten. Die Signifikanzen der beschriebenen Änderungen sind in der Abbildung 12 dargestellt.

Abbildung 13: Bilder einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Quantifizierung der Inflammation.

Bild a): Krankheitsbeginn Hirnstamm (Tag 7, Score 0,5);

Bild b): Krankheitshöhepunkt Hirnstamm (Tag 12, Score 3,5)

Die blauen Pfeile weisen auf Ansammlungen inflammatorischer Zellen.

4.3.2. Ausprägung der neuronalen Apoptose im ZNS

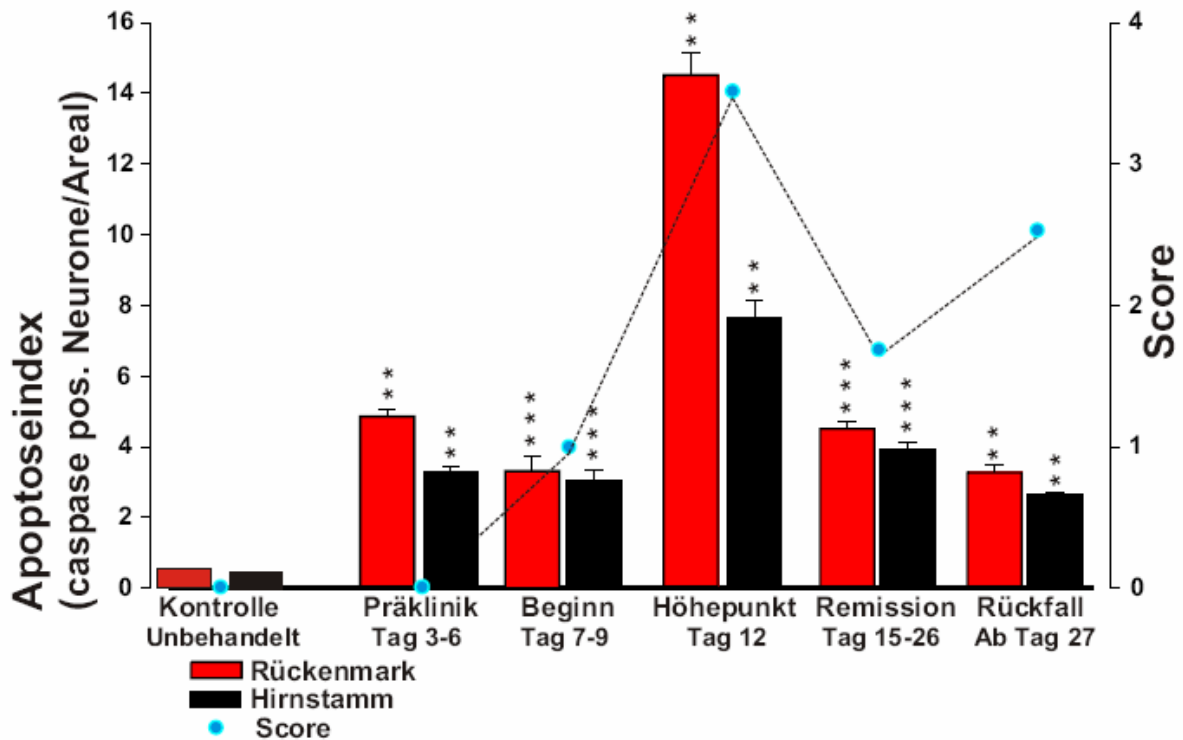


Abbildung 14 Apoptose von Neuronen im Rückenmark und Hirnstamm. Der Apoptoseindex ist ein Maß für die Anzahl apoptotischer Neurone pro Areal. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE-Gruppe dar. Die Kontrollgruppe hatte im gesamten Beobachtungszeitraum den Score 0. Im Frontalhirn der Untersuchungsgruppe (nicht graphisch dargestellt) blieb die Zahl der apoptotischen Neurone auf dem Niveau der Kontrollgruppe.

Auch in der Kontrollgruppe und in den Frontalhirnen der Untersuchungsgruppe konnte im gesamten Zeitraum Apoptose von Neuronen in sehr geringem Umfang festgestellt werden. Bereits in der präklinischen Phase konnte bei den noch symptomfreien Tieren ein signifikanter Anstieg der Apoptose von Neuronen im Gegensatz zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Im Hirnstamm erhöhte sich die Anzahl apoptotischer Neurone pro Areal um den Faktor zehn, im Rückenmark um den Faktor sechs. Mit Krankheitsbeginn war der Apoptoseindex im Vergleich zu gesunden Kontrollen im Rückenmark um den Faktor vier, im Hirnstamm weiterhin um den Faktor zehn erhöht. Zum Zeitpunkt des Erkrankungsipfels des ersten Schubs war die Anzahl apoptotischer Neurone massiv erhöht. Im Hirnstamm stieg sie um den Faktor 23, im Rückenmark um den Faktor 17 im Vergleich zu gesunden Kontrollen. In der Remissionsphase fand weiter neuronale Apoptose in erheblichem Umfang statt. Während des zweiten Schubs war ein weiterer leichter Rückgang der neuronalen Apoptose festzustellen, dabei war der Apoptoseindex im Hirnstamm um den Faktor acht, im Rückenmark um den Faktor vier gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Signifikanzen der beschriebenen Änderungen sind in der Abbildung 14 dargestellt.

Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung gegen die aktivierte Untereinheit der Caspase 3 (DAB) mit anschließender Nissl Färbung zur Quantifizierung der neuronalen Apoptose

Bild a): gesunde Maus, Hirnstamm (naiv, Score 0) ohne Nachweis neuronaler Apoptose;

Bild b): Krankheitshöhepunkt Hirnstamm (Tag 12, Score 3,5) Nachweis apoptotischer Neurone

Die schwarzen Pfeile weisen auf nicht apoptotische Neurone.

Die blauen Pfeile weisen auf apoptotische Neurone.

4.3.3. Ausprägung des axonalen Schadens im ZNS

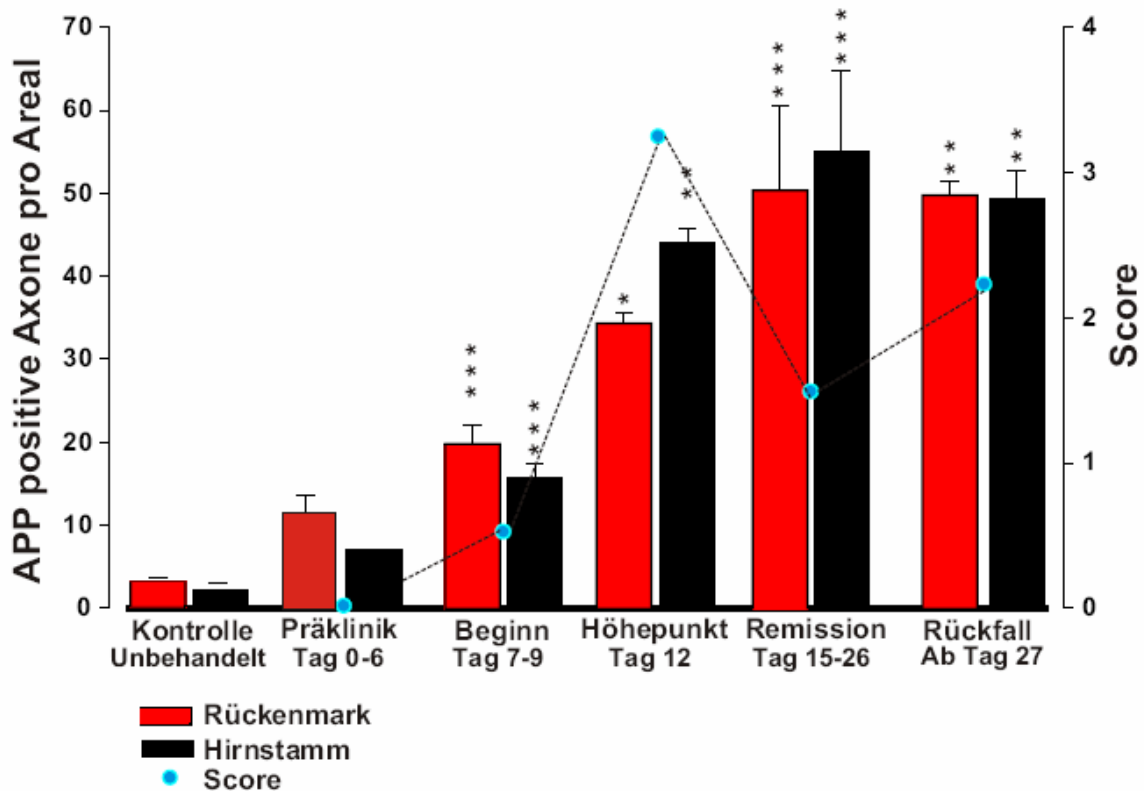


Abbildung 16 axonaler Schaden im Rückenmark und Hirnstamm. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE-Gruppe dar. Die Kontrollgruppe hatte im gesamten Beobachtungszeitraum den Score 0.

Aus der Graphik ist ersichtlich, dass auch in Gehirnschnitten gesunder Tiere APP positive Axone in geringem Maße zu finden sind. Das Frontalhirn ist in der Graphik nicht dargestellt, die Werte blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum auf Höhe der unbehandelten Kontrollen. Schon in der präklinischen Phase gab es eine signifikante Zunahme des axonalen Schadens, im Hirnstamm auf das Dreifache und im Rückenmark auf das Fünffache des Ausgangswertes. Mit Beginn der klinischen Symptome war ein weiterer signifikanter Anstieg des axonalen Schadens, im Hirnstamm auf das Achtfache und im Rückenmark auf das Sechsfache des Wertes gesunder Kontrollen feststellbar. Zum Höhepunkt der klinischen Symptome zeigte sich eine weitere Zunahme im Hirnstamm auf das ca 20-fache und im Rückenmark auf das Neunfache des Wertes gesunder Kontrollen. Während die klinischen Symptome zurückgingen zeigten sich eine weitere Zunahme des axonalen Schadens auf das 25-fache im Hirnstamm und das Neunfache im Rückenmark und auch während des zweiten Schubs waren im Rückenmark 16-fach, im Hirnstamm 22-fach mehr APP-positive-Axone feststellbar als bei den Kontrollen. Die Signifikanzen der beschriebenen Änderungen sind in der Abbildung 16 dargestellt.

Abbildung 17: Immunhistochemische APP Färbung zur Quantifizierung des axonalen Schadens

a) Rückfall, Rückenmark (Tag 27, Score 2,5)

b) Rückfall, Hirnstamm (Tag 27, Score 2,5)

Die schwarzen Pfeile weisen auf einige APP positive Neurone

4.3.4. Ausprägung der Demyelinisierung im ZNS

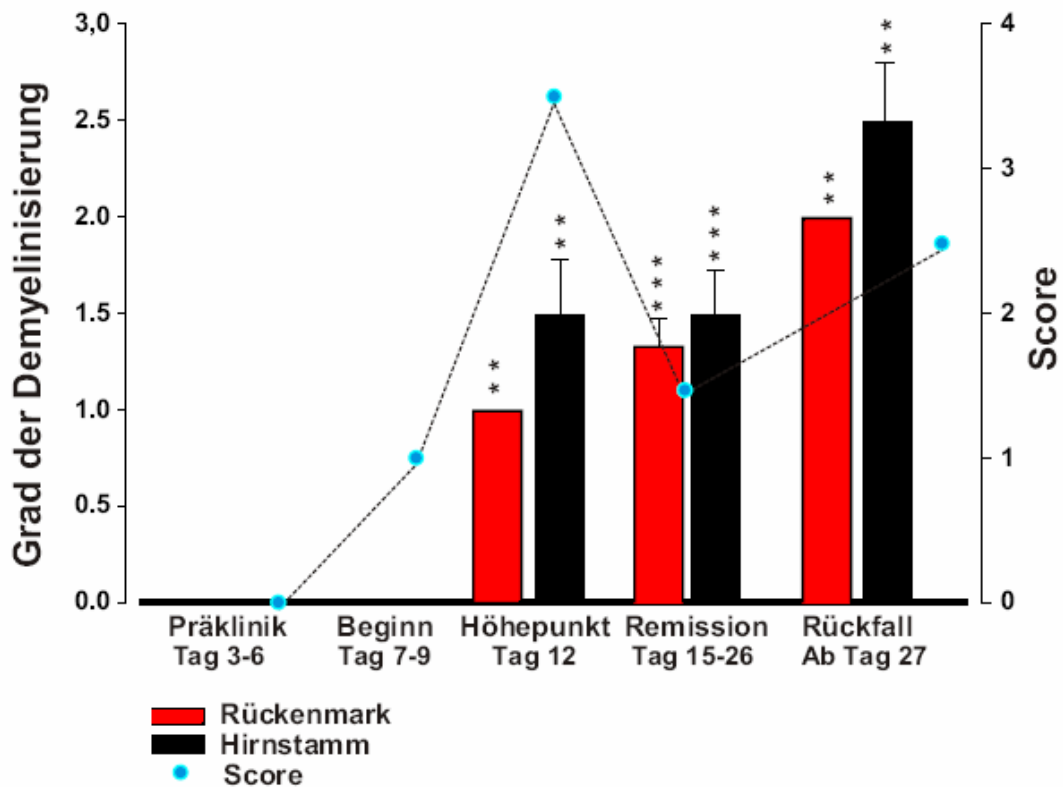


Abbildung 18: Grad der Demyelinisierung im Rückenmark und Hirnstamm. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE-Gruppe dar. Die Kontrollgruppe hatte im gesamten Beobachtungszeitraum den Score 0 in der Kontrollgruppe war keine Demyelinisierung feststellbar.

Bei den Kontrolltieren trat im gesamten Beobachtungszeitraum keine sichtbare Demyelinisierung auf. Im Hirnstamm und Rückenmark der an EAE erkrankten Tiere war bis zum Krankheitshöhepunkt keine lichtmikroskopisch sichtbare Demyelinisierung zu detektieren. Mit dem Höhepunkt des ersten Schubes ließ sich eine leichte bis mittelstarke Demyelinisierung feststellen, die kleinen Entmarkungsherden in den untersuchten Arealen entsprach. Während der Remissionsphase blieb die Stärke der Demyelinisierung unverändert und stieg dann im zweiten Schub deutlich an. Kennzeichnend war im Gegensatz zum ersten Schub das zusätzliche Auftreten sehr großer Demyelinisierungsherde in einigen Arealen. Die Signifikanzen der beschriebenen Änderungen sind in der Abbildung 18 mitdargestellt.

Abbildung 19: Luxol-Fast-Blue-Färbung zur Quantifizierung der Demyelinisierung. Die blauen Pfeile weisen auf Ansammlungen inflammatorischer Zellen die Sterne ** zeigen die meningeale Infiltration. Die schwarzen Pfeile weisen auf demyelinisierte Areale (patches).

a) Krankheitshöhepunkt, Hirnstamm (Tag 12, Score 3,5)

b) Rückfall, Hirnstamm (Tag 27, Score 2,5)

4.3.2. Übersichtstabelle histologische Parameter

Untersuchter Faktor und Region	Zeitpunkt 0	präklinische Phase	Krankheitsbeginn	Krankheitshöhepunkt	Remission	2.Schub
Inflammation Rückenmark	0,0	1,0	5,0	14,0	7,0	13,0
Inflammation Hirnstamm	0,0	1,0	3,0	11,0	4,0	8,0
Inflammation Frontalhirn	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Inflammation Kontrollgruppe	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Neuronale Apoptose Rückenmark	1,0	4,8	3,3	14,5	4,5	3,3
Neuronale Apoptose Hirnstamm	1,0	3,3	3,0	8,0	4,0	3,0
Neuronale Apoptose Frontalhirn	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Neuronale Apoptose Kontrollgruppe	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Axonaler Schaden Rückenmark	1	13	20	35	50	50
Axonaler Schaden Hirnstamm	1,0	6,0	16,0	44,0	55,0	50,0
Axonaler Schaden Frontalhirn	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Axonaler Schaden Kontrollgruppe	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Demyelinisierung Rückenmark	0,0	0,0	0,0	1,0	1,3	2,0
Demyelinisierung Hirnstamm	0,0	0,0	0,0	1,5	1,5	2,5
Demyelinisierung Frontalhirn	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Demyelinisierung Kontrollgruppe	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Abbildung 20: In dieser Übersicht sind die histologischen Parameter und ihre Änderungen als relative Daten (Faktoren), welche die Änderung im Vergleich zu gesunden Kontrollen darstellen, zusammengefasst.

4.4. Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen

Die Auswertung der Expressionsanalysen erfolgte parallel zu den histologischen Ergebnissen zusammengefasst für die gleichen klinischen Stadien. Die Tiere der Untersuchungsgruppe wurden mit den korrespondierenden gesunden Tieren der scheinimmunisierten Tiere verglichen, deren Werte unterschieden sich jedoch im gesamten Verlauf nicht von denen unbehandelter, gesunder Kontrollen, so dass sie nachfolgend vereinfacht als Kontrollgruppe dargestellt und bezeichnet werden. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde jedes Gen (getrennt nach Gewebe und Krankheitsstadium) mit der entsprechenden Kontrolle verglichen. In den Graphiken sind die p Werte des Mann-Whitney-U-Test als Sternchen über den Fehlerbalken dargestellt. Die gewonnenen Daten sind ebenfalls in einer Übersichtstabelle am Ende des Kapitels 4.4. für alle Parameter und Regionen noch einmal zusammengefasst dargestellt.

4.4.1. TRAIL-Expression bei erkrankten und Kontrolltieren

4.4.1.1. Hochregulation der TRAIL-Expression im ZNS

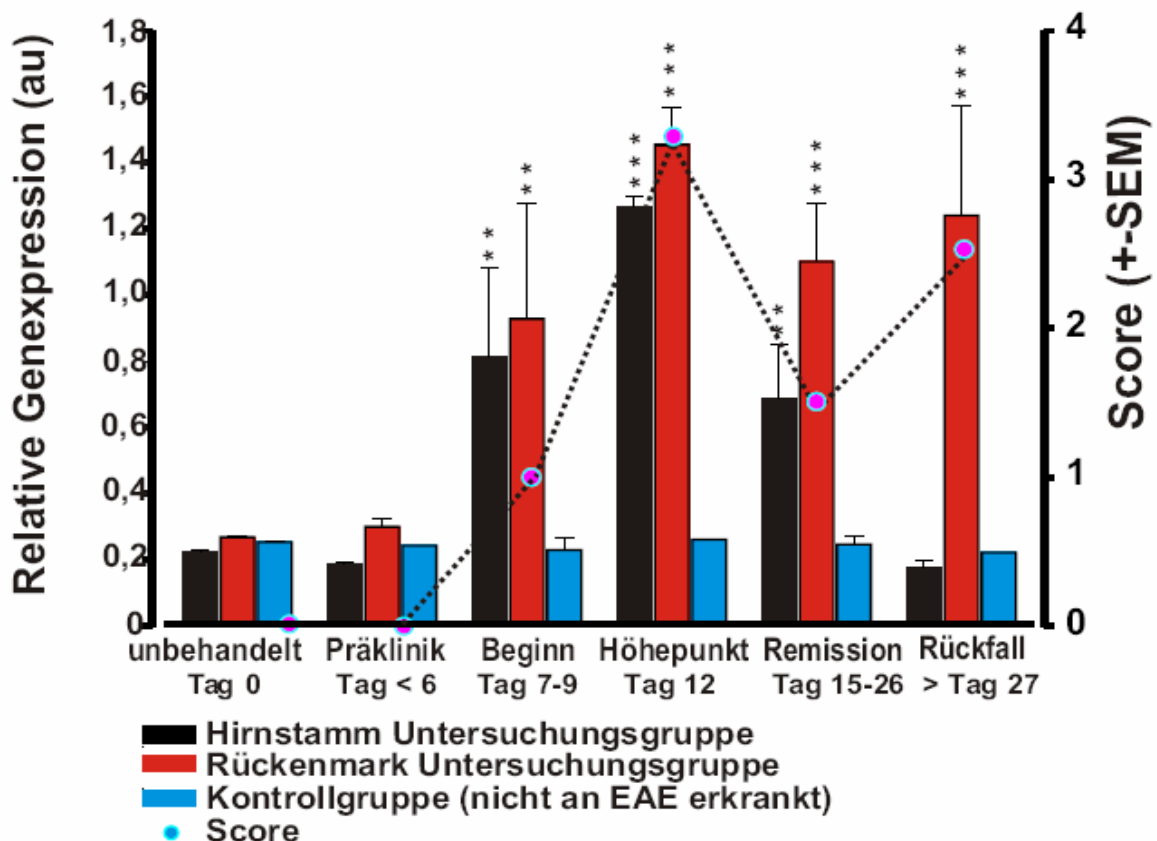


Abbildung 21: TRAIL-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien der EAE. Die unterschiedlichen Gehirnregionen sind als Balken dargestellt. Der Standardfehler des Mittelwertes ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE-Gruppe dar. Die Kontrollgruppe hatte im gesamten Beobachtungszeitraum den Score 0.

Die TRAIL-Expression wurde im Frontalhirn, im Hirnstamm und Rückenmark untersucht. Es zeigte sich, dass TRAIL in allen untersuchten Hirnregionen auf niedrigem Niveau exprimiert wird. Bereits zu Krankheitsbeginn zeigte sich eine Hochregulation von TRAIL im Hirnstamm und Rückenmark auf das ca. Vierfache des Ausgangswertes. Während des Erkrankungsgipfels des ersten Schubs stieg die Expression im Rückenmark und Hirnstamm auf das ca. Fünf- bzw. Sechsfache im Vergleich zu gesunden Kontrollen. In der Remissionsphase ging die TRAIL-Expression im Hirnstamm und Rückenmark leicht zurück. Im Rückenmark stieg die TRAIL-Expression während des zweiten Schubs erneut auf das ca. Vierfache an. Im Hirnstamm sank die Expression auf das Niveau gesunder Kontrollen. Die festgestellten Änderungen der TRAIL-Expression sind mit ihren Signifikanzniveaus in der Abbildung 21 dargestellt. Im Frontalhirn der Untersuchungsgruppe und in der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Änderungen der TRAIL-Expression festgestellt werden, beide befanden sich im gesamten Beobachtungszeitraum auf gleichbleibend niedrigem Niveau.

4.4.1.2. Hochregulation der TRAIL-Expression in der Milz

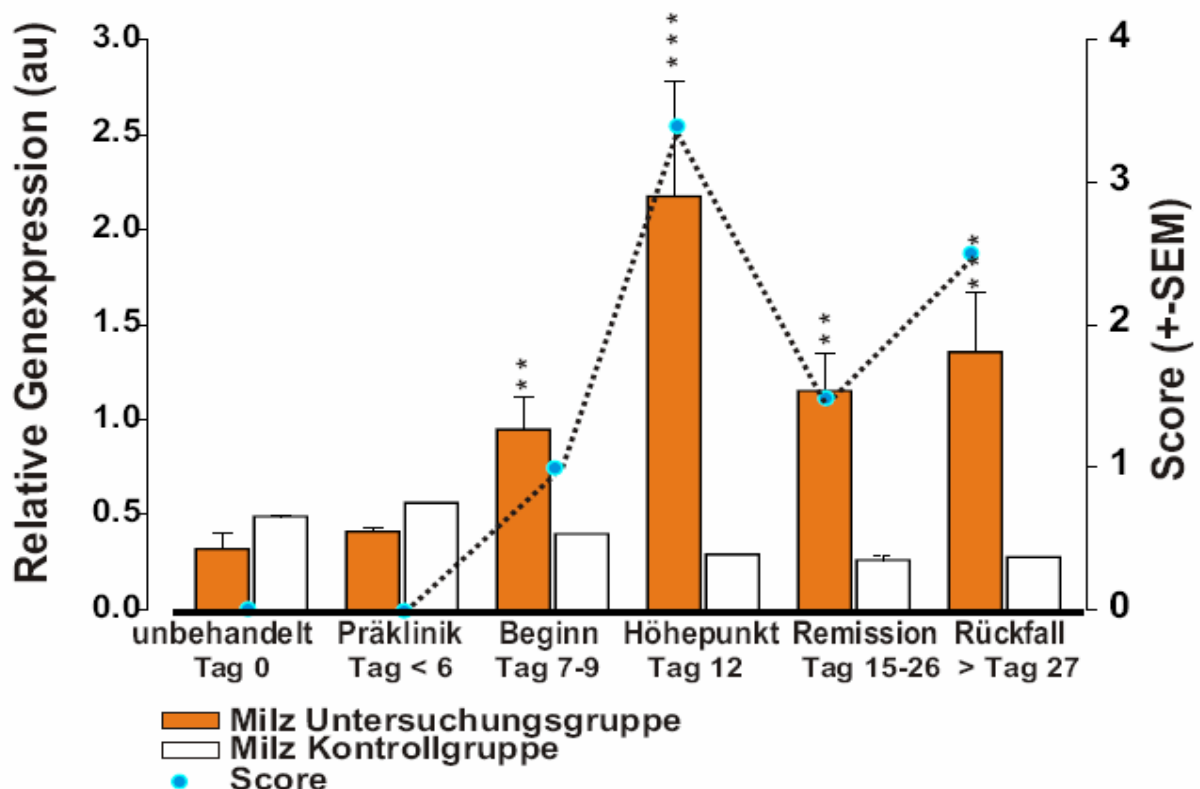


Abbildung 22: TRAIL-Expression in der Milz in den verschiedenen Krankheitsstadien. Der Standardfehler des Mittelwertes ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE-Gruppe dar. Die Kontrollgruppe hatte im gesamten Beobachtungszeitraum den Score 0.

Die TRAIL-Expression in der Milz war in der präklinischen Phase sowohl in der Kontroll- als auch in der Untersuchungsgruppe auf dem gleichen Niveau wie die Expression der untersuchten ZNS Regionen in dieser Phase. Auch in der Milz konnte bei der Kontrollgruppe keine signifikante Änderung der TRAIL-Expression während des gesamten Krankheitsverlaufs festgestellt werden. Die TRAIL-Expression in der Untersuchungsgruppe verdoppelte sich während des Erkrankungsbeginns und verfünffachte sich während des Erkrankungsgipfels im Vergleich zu gesunden Kontrollen. In der Remissionsphase ging die Expression auf das Dreifache des Ausgangsniveaus zurück. Zu Beginn des zweiten Schubs stieg die Expression wieder leicht, auf fast ein Vierfaches des Wertes gesunder Kontrollen an. Die festgestellten Änderungen der TRAIL-Expression sind mit ihren Signifikanzniveaus in der Abbildung 22 dargestellt.

4.4.2. DR5-Expression bei erkrankten und Kontrolltieren

4.4.2.1. Frühe Hochregulation der DR5-Expression im ZNS

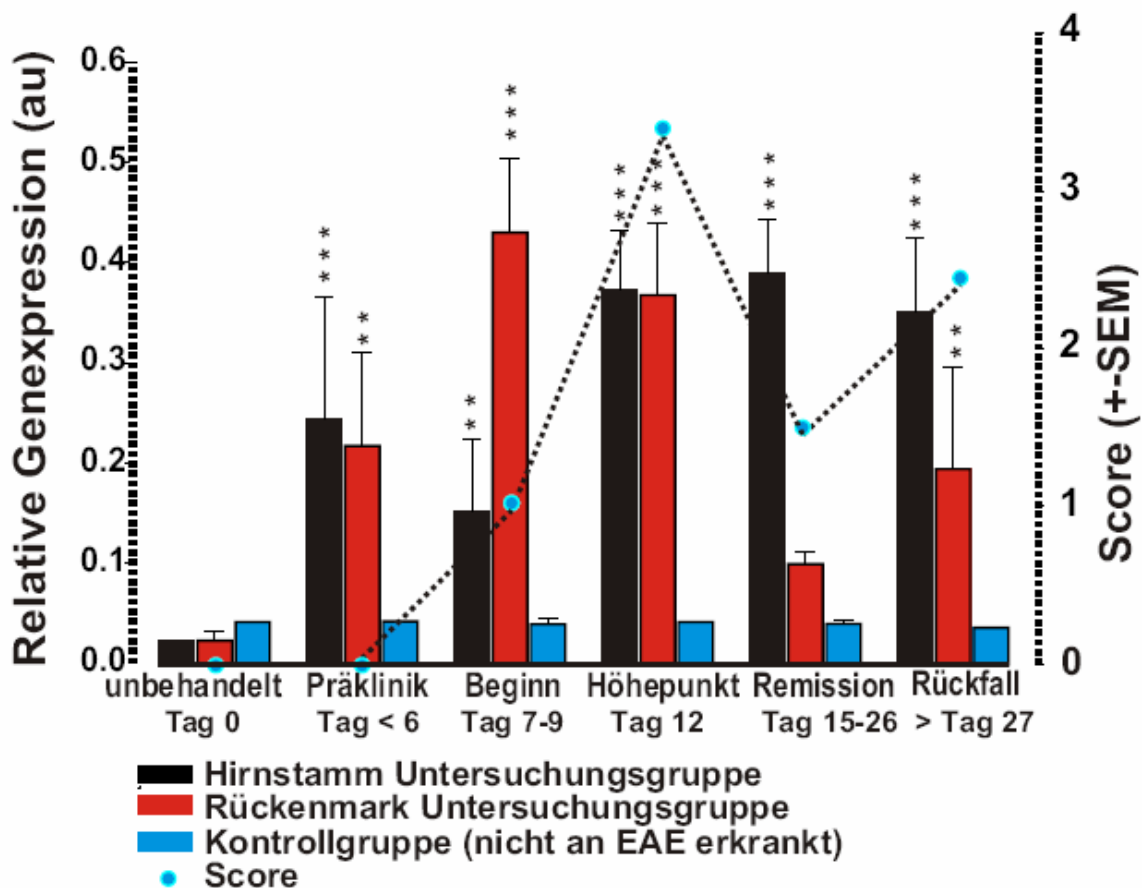


Abbildung 23: DR5-Expression im ZNS in den verschiedenen Krankheitsstadien. Die Gehirnregionen sind als Balken dargestellt. Der Standardfehler des Mittelwertes ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE-Gruppe dar. Die Kontrollgruppe hatte im gesamten Beobachtungszeitraum den Score 0.

Die DR5-Expression wurde im Hirnstamm, im Rückenmark und im Frontalhirn untersucht. In der Kontrollgruppe und den Frontalhirnen der Untersuchungsgruppe gab es keine signifikanten Änderungen der DR5-Expression im gesamten Beobachtungszeitraum. Bereits vor Beginn der ersten Symptome, in der präklinischen Phase, war DR5 im Hirnstamm (fünffach) und im Rückenmark (sechsfach) bezogen auf die Werte der Kontrollgruppe hochreguliert. Mit Erkrankungsbeginn wurde die DR5-Expression im Hirnstamm auf das Zehnfache hochreguliert. Im Rückenmark ging die DR5-Expression in dieser Phase leicht zurück und betrug, verglichen mit gesunden Tieren, das Vierfache. Zum Zeitpunkt des Erkrankungsgipfels war die DR5-Expression im Hirnstamm und Rückenmark um das ca. Neunfache erhöht. In der Remissionsphase ging die DR5-Expression im Hirnstamm auf das dreifache Expressionsniveau der Kontrolltiere zurück. Im Rückenmark blieb die Expression während der Remissionsphase und dem anschließenden zweiten Schub auf konstant hohem Niveau. Die DR5-Expression im Hirnstamm stieg während des zweiten Schubs wieder auf das Vierfache im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren an. Die erwähnten Änderungen der DR5-Expression im ZNS sind mit ihren Signifikanzniveaus in der Abbildung 23 dargestellt.

4.4.2.1. DR5 Expression in der Milz herunterreguliert

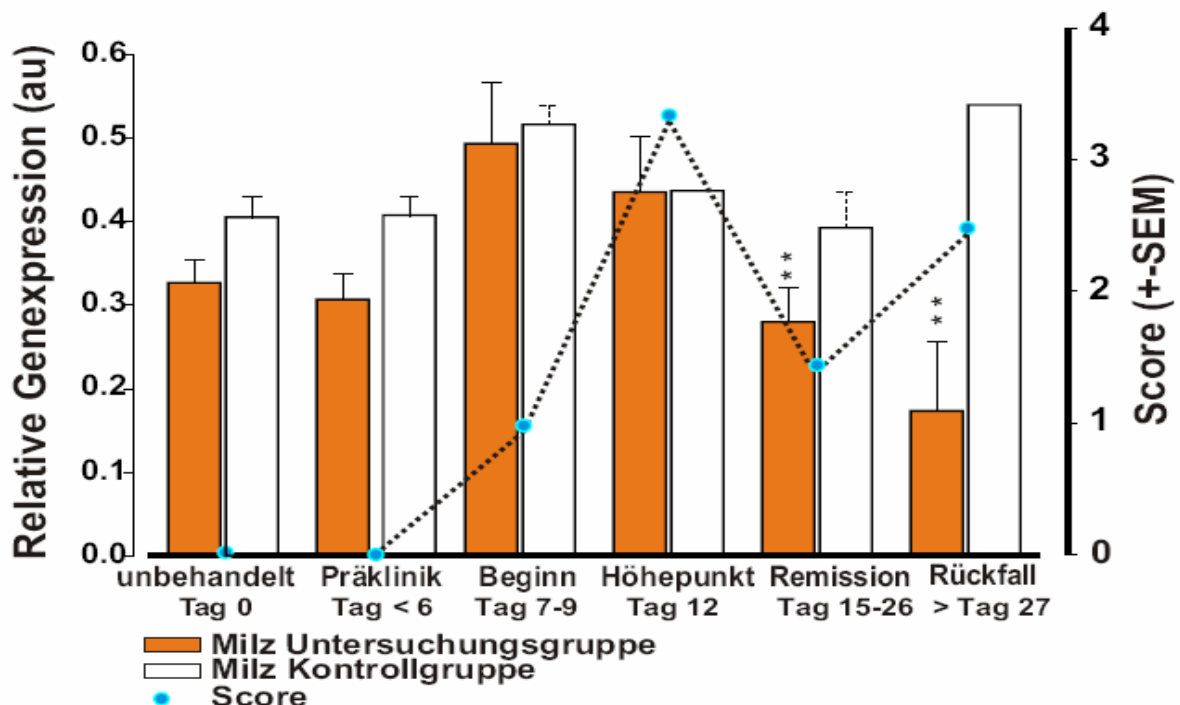


Abbildung 24: DR5-Expression in der Milz in den verschiedenen Krankheitsstadien. Der Standardfehler des Mittelwertes ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE-Gruppe dar. Die Kontrollgruppe hatte im gesamten Beobachtungszeitraum den Score 0.

Die Grundexpression von DR5 in der Milz lag sowohl in der Kontroll- als auch in der Untersuchungsgruppe im Vergleich zu der Grundexpression von DR5 im Gehirn etwa zehnfach höher. In der präklinischen Phase sank die DR5-Expression in den Milzen der Untersuchungsgruppe auf einen signifikant niedrigeren Wert als bei den gesunden Kontrollen. Mit dem Erkrankungsbeginn bis hin zum Erkrankungsgipfel stieg dieser Wert etwas an, so dass er sich auf dem gleichen Niveau mit der Kontrollgruppe befand. In der Remission sank die Expression von DR5 in der Untersuchungsgruppe wieder auf einen signifikant niedrigeren Level als in der Kontrollgruppe. Dieser Trend setzte sich auch während des zweiten Schubs fort, so dass die DR5-Expression in der Untersuchungsgruppe zu diesem Zeitpunkt nur ein Drittel des Niveaus der Kontrollgruppe erreichte. Die erwähnten Änderungen der DR5-Expression in der Milz sind mit ihren Signifikanzniveaus in der Abbildung 24 dargestellt.

4.4.3. CD95-Expression bei erkrankten und Kontrolltieren

4.4.3.1. Hochregulation der CD95-Expression im ZNS

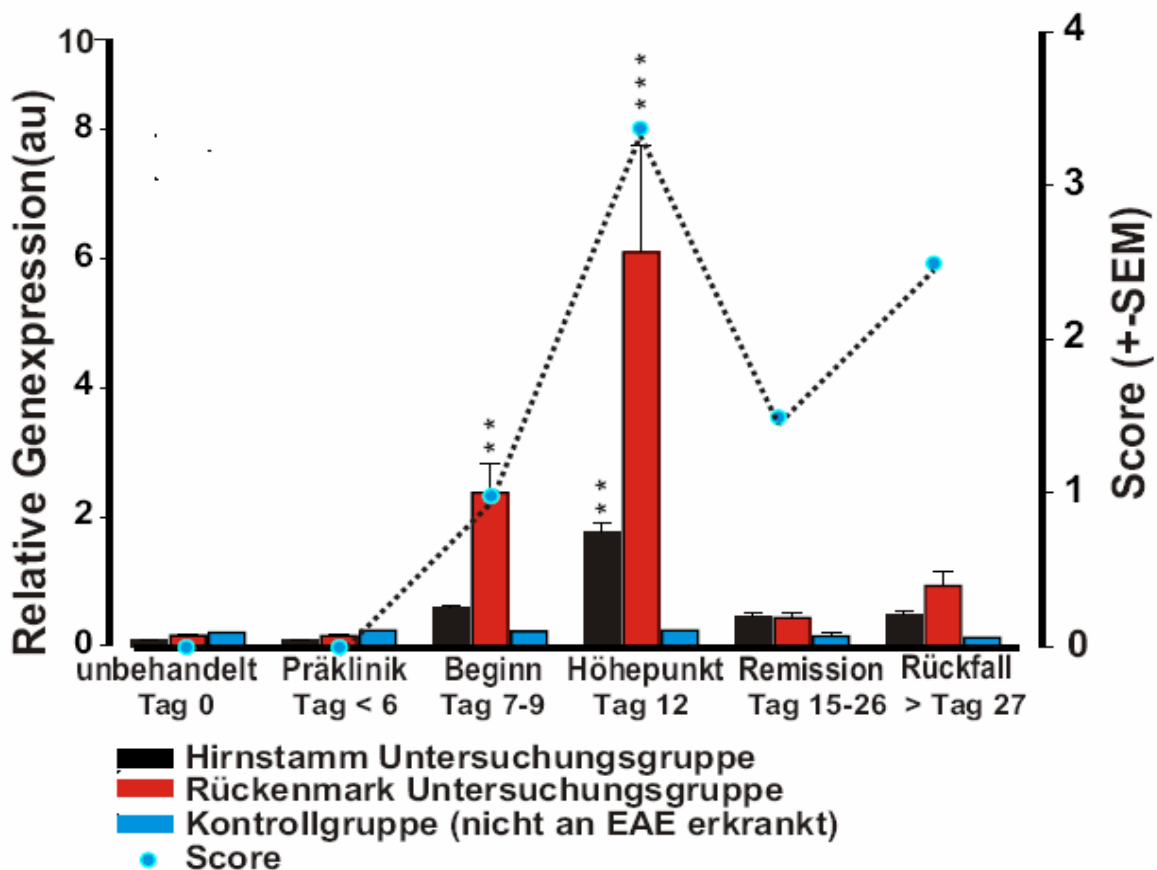


Abbildung 25: CD95-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien der EAE. Die unterschiedlichen Gehirnregionen sind als Balken dargestellt. Der Standardfehler des Mittelwertes ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE-Gruppe dar. Die Kontrollgruppe hatte im gesamten Beobachtungszeitraum den Score 0.

Die CD95-Expression wurde im Hirnstamm, im Rückenmark und im Frontalhirn untersucht. In der Phase des Krankheitsbeginns stieg die CD95-Expression im Hirnstamm um den Faktor drei, im Rückenmark sogar um den Faktor zehn im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während des Erkrankungshöhepunktes erreichte die Expressionsänderung ihren Höhepunkt und war im Hirnstamm siebenfach, im Rückenmark 25-fach erhöht. In der Remissionsphase gingen die Änderungen im Hirnstamm und Rückenmark auf das Doppelte des Ausgangswertes zurück. Mit Beginn des zweiten Schubs blieb diese Situation im Hirnstamm gleich, im Rückenmark war ein Wiederanstieg auf das Vierfache des Ausgangswertes zu verzeichnen. In der Kontrollgruppe und im Frontalhirn der Untersuchungsgruppe trat im gesamten Beobachtungszeitraum keine statistisch signifikante Änderung der CD95-Expression auf. Die erwähnten Änderungen der CD95-Expression im ZNS sind mit ihren Signifikanzniveaus in der Abbildung 25 dargestellt.

4.4.3.2. Hochregulation der CD95-Expression in der Milz

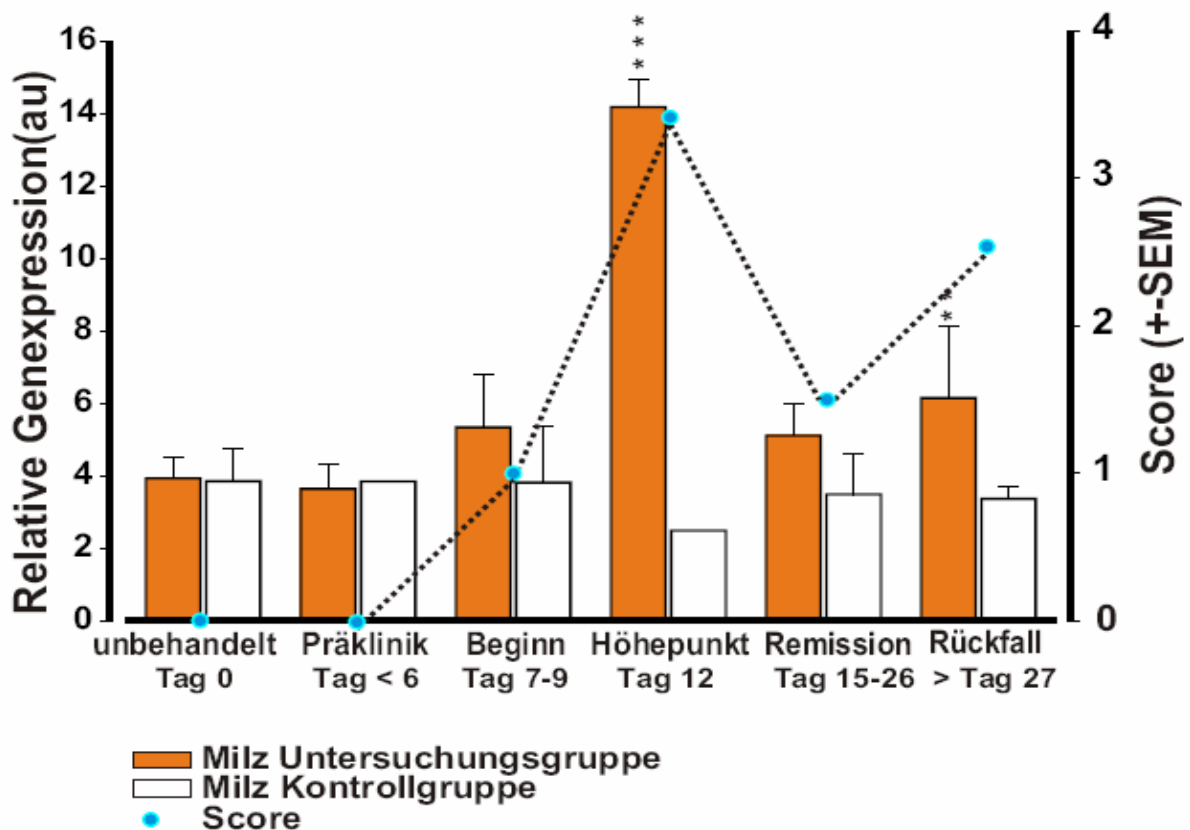


Abbildung 26: CD95-Expression in der Milz in den verschiedenen Krankheitsstadien. Der Standardfehler des Mittelwertes ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE-Gruppe dar. Die Kontrollgruppe hatte im gesamten Beobachtungszeitraum den Score 0.

In der Untersuchungs- und Kontrollgruppe befand sich die CD95-Expression in der Milz, verglichen mit der im Gehirn, auf einem zehnfach höheren Ausgangslevel. In den gesunden Kontrolltieren konnte keine statistisch signifikante Änderung der CD95-Expression im ZNS über den gesamten Beobachtungszeitraum festgestellt werden. Erst mit dem Erkrankungsgipfel stieg die Expression von CD95 auf das fünffache Niveau im Vergleich zu den Kontrolltieren. In der Remissionsphase sank die CD95-Expression in der Milz wieder auf das Level gesunder Kontrolltiere. Während des zweiten Schubs stieg die Expression von CD95 nochmals leicht an. Die erwähnten Änderungen der CD95-Expression in der Milz sind mit ihren Signifikanzniveaus in der Abbildung 26 dargestellt.

4.4.4. CD95-Ligand-Expression bei erkrankten und Kontrolltieren

4.4.4.1. Hochregulation der CD95-Ligand-Expression im ZNS

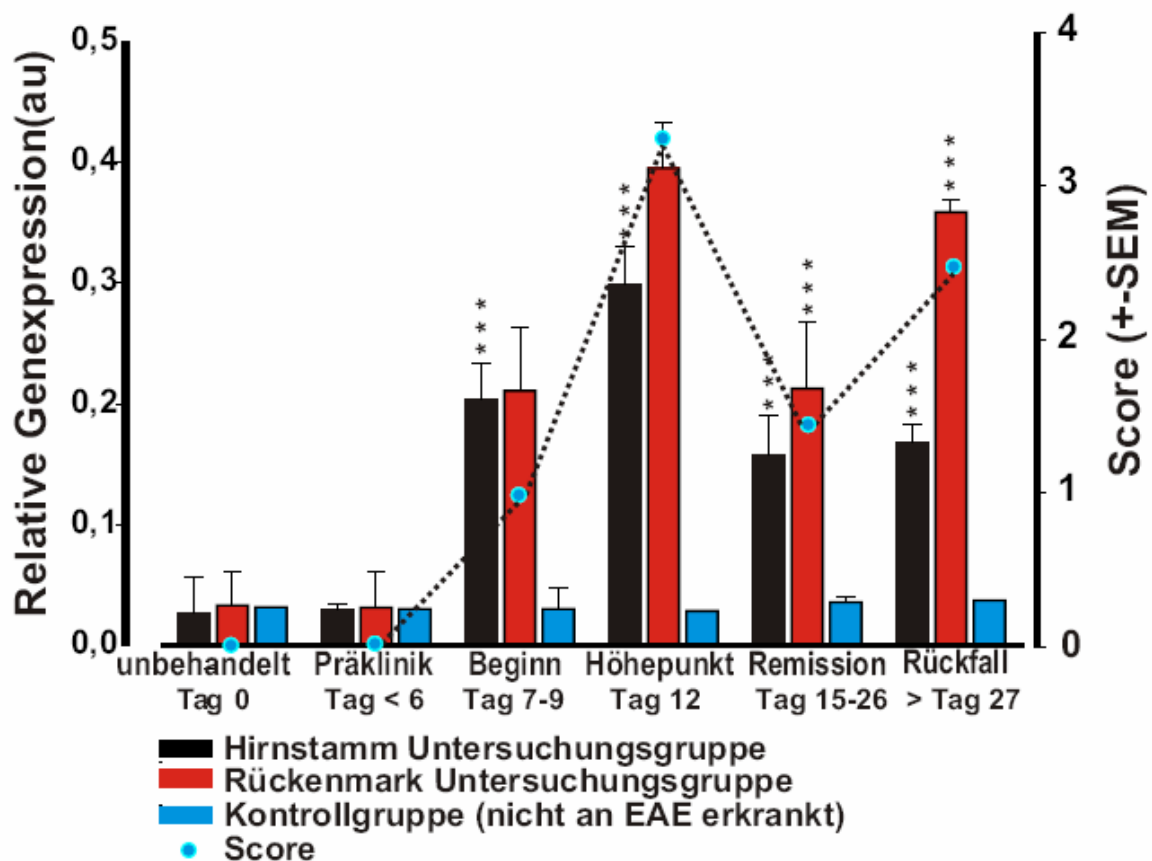


Abbildung 27: CD95-Ligand-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien der EAE. Die unterschiedlichen Gehirnregionen sind als Balken dargestellt. Der Standardfehler des Mittelwertes ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE-Gruppe dar. Die Kontrollgruppe hatte im gesamten Beobachtungszeitraum den Score 0.

Die CD95-Ligand-Expression wurde im Hirnstamm, im Rückenmark und im Frontalhirn untersucht. Die Grund-Expression des CD95-Liganden in allen ZNS-Regionen war auf einem zehnfach niedrigeren Niveau als die Expression von CD95 im ZNS. In der Kontrollgruppe und im Frontalhirn der Untersuchungsgruppe war keine signifikante Änderung der CD95-Ligand-Expression im gesamten Beobachtungszeitraum festzustellen. Erst mit dem Krankheitsbeginn stieg die CD95-Ligand-Expression im Rückenmark und Hirnstamm auf das ca. Siebenfache des Wertes gesunder Kontrollen. Während des Erkrankungsgipfels erreichte die CD95-Ligand-Expression ihren Höchstwert und war im Rückenmark um das 13-fache, im Hirnstamm um das Zehnfache erhöht. In der Remissionsphase ging die Expression des CD95-Ligand etwas zurück, war aber im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf das Fünffache im Hirnstamm bzw. das Siebenfache im Rückenmark erhöht. Im zweiten Schub kam es zu einem erneuten Anstieg der CD95-Ligand-Expression im Rückenmark auf das Neunfache des Ausgangswertes. Der Wert für den Hirnstamm blieb im Vergleich zur Remissionsphase konstant erhöht. Die erwähnten Änderungen der CD95-Ligand-Expression im ZNS sind mit ihren Signifikanzniveaus in der Abbildung 27 dargestellt.

4.4.4.2. Hochregulation der CD95-Ligand-Expression in der Milz

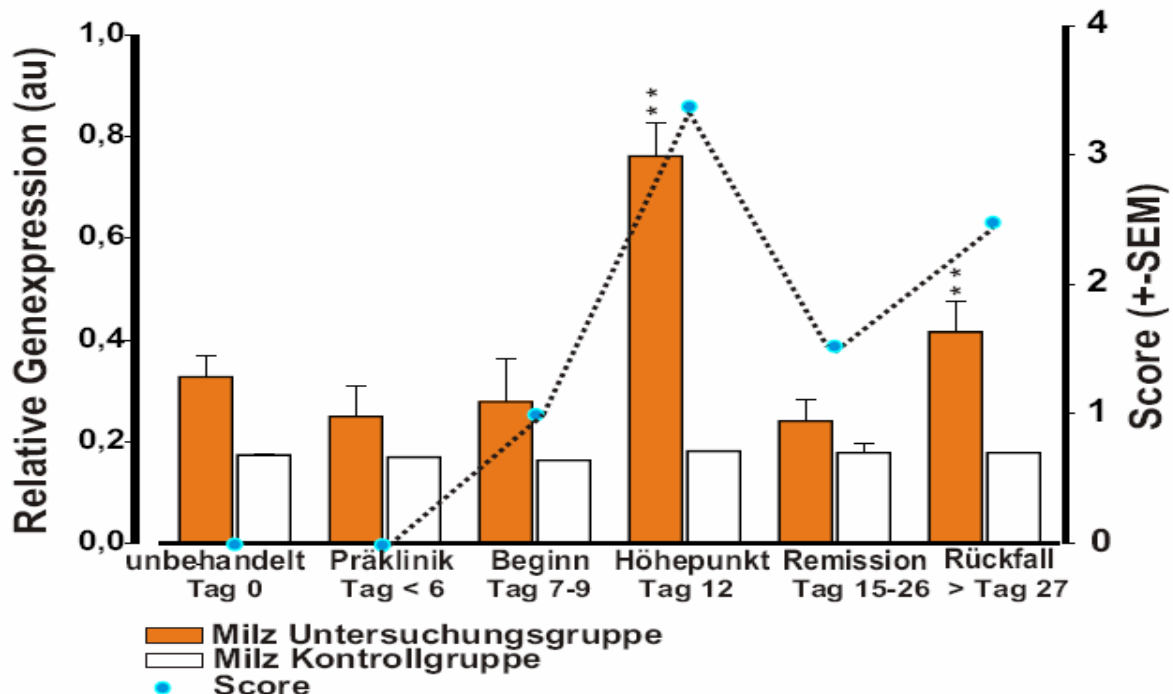


Abbildung 28: CD95-Ligand-Expression in der Milz in den verschiedenen Krankheitsstadien. Der Standardfehler des Mittelwertes ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Punkte stellen die mittleren Scorewerte der EAE-Gruppe dar. Die Kontrollgruppe hatte im gesamten Beobachtungszeitraum den Score 0.

Die Grundexpression des CD95-Liganden in der Milz war im Vergleich zu der des CD95-Liganden in allen ZNS-Regionen sowohl in der Untersuchungs- als auch in der Kontrollgruppe zehnfach höher. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes gab es in der Kontrollgruppe keine statistisch signifikante Expressionsänderung des CD95-Liganden. Die Expression des CD95-Liganden in der Untersuchungsgruppe änderte sich erst mit dem Erkrankungshöhepunkt des ersten Schubs auf das Dreifache im Vergleich zu gesunden Kontrollen und sank in der Remissionsphase wieder auf das Niveau der gesunden Kontrolltiere. Im Zuge des zweiten Schubs stieg die Expression des CD95-Ligand in der Untersuchungsgruppe wieder leicht an und war, verglichen mit den Kontrolltieren, verdoppelt. Die erwähnten Änderungen der CD95-Ligand-Expression in der Milz sind mit ihren Signifikanzniveaus in der Abbildung 28 dargestellt.

4.4.5. Übersichtstabelle Expressionsdaten

Untersuchter Faktor und Region	Zeitpunkt 0	präklinische Phase	Krankheitsbeginn	Krankheitshöhepunkt	Remission	2.Schub
TRAIL Rückenmark	1	1	3	5	3,7	4
TRAIL Hirnstamm	1	1	4,4	7	3,7	1
TRAIL Frontalhirn	1	1	1	1	1	1
TRAIL ZNS Kontrollgruppe	1	1	1	1	0,5	0,5
TRAIL Milz	1	1	2	5	3	3
TRAIL Milz Kontrollgruppe	1	1	1	0,5	0,5	0,5
DR5 Rückenmark	1	5,6	3,5	8,5	9	8
DR5 Hirnstamm	1	4,7	9,5	8	2	4
DR5 Frontalhirn	1	1	1	2	1,6	2
DR5 ZNS Kontrollgruppe	1	1	1	1	1	1
DR5 Milz	1	1	1	1	1	0,5
DR5 Milz Kontrollgruppe	1	1	1	1	1	1
CD95 Rückenmark	1	1	10	25,6	2	4
CD95 Hirnstamm	1	0,6	2,6	7,5	2	2
CD95 Frontalhirn	1	1	1	1	1	1,6
CD95 ZNS Kontrollgruppe	1	1	1	1	1	1
CD95 Milz	1	1	1	3,7	1	1
CD95 Milz Kontrollgruppe	1	1	1	1	1	1
CD95 Ligand Rückenmark	1	1	7	13	7	12
CD95 Ligand Hirnstamm	1	1	7	10	5	5,6
CD95 Ligand Frontalhirn	1	1	1	1,5	1	1
CD95 Ligand ZNS Kontrollgruppe	1	1	1	1	1	1
CD95 Ligand Milz	1	1	1	3	1	1
CD95 Ligand Milz Kontrollgruppe	1	1	1	1	1	1

Abbildung 29: In dieser Übersicht sind die Expressionsänderungen als relative Daten (Faktoren), welche die Expressionsänderung im Vergleich zu gesunden Kontrollen darstellen, zusammengefasst.