

**Identifizierung und Evaluierung neuer Therapiekonzepte
der Multiplen Sklerose in der experimentellen
autoimmunen Enzephalomyelitis**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin –
der Universität Regensburg

vorgelegt von

André Müller
Aus Rotenburg/Wümme

Regensburg, 2005

Promotionsgesuch eingereicht am: 22.02.2005

Die Arbeit wurde angeleitet von: Dr. Gerhard Giegerich und Dr. Andreas Steinbrecher

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. A. Kurtz (Vorsitzender)
Prof. Dr. C. Aslanidis (1.Prüfer)
Prof. Dr. U. Bogdahn (2.Prüfer)
Prof. Dr. R. Witzgall (3.Prüfer)

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	5
Die Multiple Sklerose	5
Ursachen der MS	5
Immunpathologie und -pathogenese der MS	6
Therapie der MS	7
Immunpathogenese der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)	7
Aktuelle Vorstellungen zur Immunpathogenese entzündlicher, demyelinisierter Läsionen	8
Die Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (TNFSF)	10
TNFSF vermittelte Apoptose	12
TNFSF vermittelte Aktivierung von NF-κB	12
Mitglieder der TNF-Familie und Autoimmunkrankheiten des ZNS	13
Der TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK)	15
DNA-Vakzinierung	16
DNA-Mikroarrays	17
Aufgabenstellung	20
MATERIAL UND METHODEN	21
Verwendete Materialien	21
Chemikalien und Reagenzien	21
Puffer und Medien	23
Kits	25
Antikörper	25
Geräte	25
Vektoren bzw. Plasmide	26
Software	28
Molekularbiologische Methoden	28
RNA-Isolierung	28
cDNA-Synthese	28
Polymerase Kettenreaktionen (PCR)	29
Restriktionsverdau	29
Agarose-Gelelektrophorese	29
Gelelution	29
Quantifizierung von Nukleinsäuren	30
Ligation	30
Transformation	30
Plasmidisolation	31
Kolonie-PCR	31
Sequenzierungen	31
Klonierungsansätze	31
Produktion von rekombinanten Proteinen	33
Expression der Protein	33
Extraktion und Reinigung	33
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
Detektion der rekombinanten Proteine	34
Dialyse	34
Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	34
Analytische Methoden	35
Western Blot zur Bestimmung der Proteinexpression	35
RealTime-PCR	36
Gesamtcholesterin-Bestimmung im Ratten ZNS	36
Histopathologische Untersuchungen	37
Zellbiologische Methoden	37
Proliferationsassay mit Lymphknotenzellen (LNC)	38
CCL2-Assays (MCP-1)	38
Tierexperimentelle Methoden	39
Tiere	39
DNA-Vakzinierung	40
Kontrolle der Transkription der Vakzinierungsansätze	40
ELISA zur Antikörperbestimmung	41
Protein-Vakzinierung	41
EAE-Induktion und klinische Evaluation	42
Applikation des Bradykinin Rezeptor 2 (B ₂)-Inhibitor LF 16-0687 Ms in der adoptiven Transfer EAE	43
Applikation des Bradykinin Rezeptor 1 (B ₁)-Inhibitor (Des-Arg ⁹ ,Leu ⁸)-Bradykinin in der AT-EAE	44
Narkose der Tiere	44
Perfusion der Tiere	44
Statistik	45
Expressionsanalyse mittels Affymetrix-Biochips	45

Verwendete Biochips	45
Vorbereitung der Proben	46
Überprüfung der Qualität und Analyse der Daten	47
ERGEBNISSE.....	48
<i>DNA-Vakzinierung</i>	48
Bestimmung der Ratten TWEAK und Fn14-Sequenzen	48
Injektion der Vakzinierungskonstrukte.....	48
Expression der Vakzinierungskonstrukte	49
Einfluss der DNA-Vakzinierung auf die MOG-induzierte EAE von DA Ratten.....	50
Kontrolle der Antikörperantwort nach DNA-Vakzinierung	52
TWEAK-Protein ist an der Injektionsstelle nicht detektierbar	52
Expressionsstudie mit inguinalen Lymphknoten TWEAK-DNA-vakzinierter Ratten.....	53
TWEAK-DNA-Vakzinierung verstärkt die ZNS-Infiltration von T-Zellen zu Beginn der Krankheit.....	54
TWEAK-DNA-Vakzinierung hat keinen Einfluss auf die Proliferation von autoreaktiven T-Zellen.....	55
TWEAK induziert CCL2-Produktion bei Astrozyten und verstärkt sie in zerebralen Endothelzellen.....	56
TWEAK-DNA-Vakzinierung führt nicht zur erhöhten CCL2-Konzentration im Serum	57
Produktion von TWEAK-Protein nach Transfektion von Astrozyten	57
<i>Proteinvakzinierung zur Antikörperinduktion</i>	58
Vakzinierungen mit rTWEAKext/Alum und rFn14/Alum erzeugen starke Antikörperantworten.....	58
Antikörper mit Spezifität für rTWEAKext bzw. rFn14 können TWEAK-Effekte neutralisieren.....	59
Die <i>in vivo</i> Blockade von TWEAK und Fn14 verbessert den klinischen Verlauf in zwei EAE-Modellen.....	60
Die rTWEAKext- und rFn14-Vakzinierungen vermindern die Ausprägung von entzündlichen ZNS-Läsionen.....	62
Die TWEAK-Proteinvakzinierung verringert nicht die Enzephalitogenität der autoreaktiven T-Zellen	63
<i>EAE-Expressionsstudie</i>	65
EAE-Verlauf der ausgewählten Ratten.....	65
Übersicht	66
Expressionsprofile der nicht in inflammatorischen Zellen exprimierten Gene	69
Abnahme Oligodendrozyten-spezifischer Transkripte.....	71
Erniedrigung der Gene der Cholesterin Biosynthese	74
Transkripte für Ionenkanäle, -transporter und Gene des Neurotransmitter-Metabolismus	78
Neuroregeneration in der EAE der DA-Ratte	80
Die EAE läuft einher mit verstärkter Protein-Degradation	83
Verstärkte Expression von MHC-Molekülen	87
Expression von DC-spezifischen Genen in der EAE.....	88
Gene des TGFβ-Signalwegs	89
B-Zellen in der EAE	94
<i>Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)</i> in der EAE	97
Kinine in der EAE	98
DISKUSSION	103
<i>TNF-Familienmitglieder in der EAE</i>	103
Interpretation der Ergebnisse der DNA-Vakzinierung	103
Interpretation der Ergebnisse der Proteinvakzinierung	106
<i>Expressionsprofile der MOG-induzierten EAE der DA-Ratte</i>	111
Einordnung dieser Studie in bereits publizierte, ähnliche Expressionsstudien	111
Untersuchung der ausschließlich im ZNS exprimierten Gene	112
Oligodendrozyten-spezifische Gene	113
Cholesterin-Metabolismus in der MOG-induzierten EAE.....	115
Ionenkanäle, -transporter und Neurotransmitter-Metabolismus	119
Neuroregeneration in der EAE der DA-Ratte	120
Proteindegradation und Antigenpräsentation in der MOG-induzierten EAE.....	124
Dendritische Zellen in der EAE.....	127
Die Rolle von TGFβ in der MOG-induzierten EAE von DA-Ratten	128
B-Zellen in der MOG-induzierten EAE von DA-Ratten	130
<i>Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)</i> in der EAE	133
Die Rolle von Kininen in der EAE	134
ZUSAMMENFASSUNG	137
ANHANG	139
<i>Abkürzungen</i>	139
<i>Referenzen</i>	141
<i>Eigene Veröffentlichungen</i>	157
<i>Danksagung</i>	158

Einleitung

Die Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) wird definiert als eine chronisch entzündliche, demyelinisierende Krankheit des zentralen Nervensystems (ZNS) unklarer Ursache. Charakterisiert wird sie durch multiple entzündliche, demyelinisierte Läsionen im ZNS, die durch den Angriff körpereigener Immunzellen auf die Myelinscheiden der Neuronen verursacht werden. Diese Läsionen resultieren in einer Vielzahl von neurologischen Symptomen, wie z.B. Seh- oder Sensibilitätsstörungen, Gang- und Gleichgewichtsstörungen oder Lähmungen. Der klinische Verlauf der MS ist sehr variabel. Bei einem Großteil der Patienten wird die MS in einem Alter zwischen 20 und 40 Jahren diagnostiziert. Sehr häufig (~80%) zeigt sich zu Beginn ein schubförmiger-remittierender Verlauf der Krankheit; dabei werden klinische Schübe von Phasen gefolgt, in denen es zur mehr oder weniger kompletten Erholung kommt. Die klinischen Symptome sind dabei eine direkte Konsequenz von reversiblen Leitungsblöcken sowie von Demyelinisierungen. Die Erholungsphase ist mit einer signifikanten Remyelinisierung der betroffenen Areale verbunden. Trotzdem kommt es bereits zum irreversiblen Verlust von Axonen (Ferguson et al., 1997; Kornek et al., 2000). In späteren Phasen entwickeln ca. 40% einen sekundär progressivem Verlauf - d.h. eine schlechende, kontinuierliche Zunahme klinischer Symptome unabhängig von Schüben. Dieses Stadium der MS ist weniger gut mit Immuntherapeutika behandelbar als das schubförmige-remittierende Anfangsstadium (Hohol et al., 1999). Nur ein geringer Teil von Patienten hat von Beginn an einen primär chronisch-progredienten Verlauf. Während die Erkrankung sich bei einem Großteil der Patienten über einen Zeitraum von Jahrzehnten entwickelt, kommt es in einzelnen Fällen, insgesamt ca. fünf Prozent der Erkrankungen zu einer akuten Form und in wenigen Jahren zu schweren Behinderungen oder sogar zum Tod. Auf der anderen Seite gibt es Patienten, die nie einen sekundär, progressiven Verlauf entwickeln.

Ursachen der MS

Die MS ist die am häufigsten vorkommende entzündliche, demyelinisierende Krankheit des ZNS in Europa und Nordamerika – 68 bis 80 von 100.000 Menschen sind dort von der MS betroffen. Sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren werden als Ursache für die MS diskutiert. In Zwillingsstudien wurde gezeigt, dass es bei eineiigen Zwillingen 30%

Übereinstimmung bezüglich des Ausbruchs der Krankheit gibt, während es bei zweieiigen nur 4% sind (Oksenberg and Barcellos, 2000; Sadovnick et al., 1993). Bekannt ist, dass bestimmte Allele der HLA DR und DQ Gene die Suszeptibilität für MS beeinflussen (Noseworthy et al., 2000; Weinshenker et al., 1998). Unter den Umweltfaktoren werden vor allem infektiöse Agenzien, aber auch geografische und sozioökonomische Gründe als ätiologische Faktoren diskutiert. Zwar wurde eine Vielzahl von hauptsächlich viralen Pathogenen als mögliche Ursache betrachtet, aber die Verknüpfung dieser Erreger mit der MS bleibt noch fragwürdig (Derfuss et al., 2001); so wurde noch keiner dieser Erreger reproduzierbar aus dem ZNS von MS-Patienten isoliert.

Immunpathologie und -pathogenese der MS

MS-Läsionen lassen sich vier unterschiedlichen Subtypen zuteilen (Lassmann, 2001; Lucchinetti et al., 2000). Allen Läsionstypen ist es gemeinsam, dass in ihnen CD3⁺ T-Lymphozyten (Traugott et al., 1983), aktivierte Makrophagen und Mikroglia, die in aktiven Läsionen mit Myelin-Reste beladen sind (Bruck et al., 1995; Ferguson et al., 1997; Lucchinetti et al., 2000; Storch et al., 1998), und B-Zellen (Esiri, 1977; Lucchinetti et al., 2000) auftreten. Detaillierte immunpathologische Untersuchungen haben aber Unterschiede in der Zusammensetzung der zellulären Infiltrate, Komplement- und Immunglobulin-Ablagerungen und bei der Apoptose aufgezeigt. Wesentlich ist, dass bei individuellen Patienten alle Läsionen dem gleichen Typ entsprechen, so dass diese Heterogenität unterschiedliche Pathomechanismen nahelegt. Typ I und II Läsionen weisen starke Ähnlichkeiten zu den Läsionen auf, die in Modellen der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der MS, auftreten, mit perivaskulären Infiltraten aus T-Zellen und aktivierte Makrophagen (Martin and McFarland, 1995). In Typ II Läsionen, dem häufigsten Läsionstyp in der MS, kommen zusätzlich Immunglobulin- und Komplement-Ablagerungen an den Myelin-Scheiden mit lokaler Aktivierung der Komplement-Kaskade vor (Lucchinetti et al., 2000). Typ III und IV Läsionen sind nicht perivaskulär angeordnet, und es gibt keine Anzeichen für eine Ablagerung von Immunglobulinen und Komplementfaktoren. In Typ III-Läsionen zeigen die Oligodendrozyten Anzeichen der Apoptose. In Typ IV Läsionen kommt es im Vergleich dazu zu einem massiveren Verlust von Oligodendrozyten in der Nachbarschaft von Läsionen, so dass hier eine primäre Oligodendropathie diskutiert wird (Lucchinetti et al., 2000).

Mit wenigen Ausnahmen lassen sich die pathologischen Subtypen der klinischen Form der MS noch nicht zuordnen.

Therapie der MS

Mangels bekannter Ursache existiert bisher keine kausale Therapie der MS. Akute Krankheitsschübe können durch kurzzeitige hoch dosierte Kortikosteroidgaben abgeschwächt und abgekürzt werden (Beck et al., 1993). Der Langzeitverlauf der Erkrankung wird hierdurch wahrscheinlich aber nicht beeinflusst.

Zur Senkung der Schubfrequenz bei schubförmigem Verlauf werden seit einigen Jahren vor allem rekombinantes Interferon- β (Noseworthy et al., 1999) und das synthetische Polypeptidgemisch Glatirameracetat (Mancardi et al., 1998) eingesetzt. Auch für intravenöse Immunglobuline gibt es Wirksamkeitshinweise in der schubförmigen MS (Noseworthy et al., 1999).

Bei besonders ungünstigen Verlaufsformen mit rascher klinischer Verschlechterung kommt eine Therapie mit Immunsuppressiva bzw. Zytostatika in Betracht (Hartung et al., 2002). Wegen der allgemeinen Langzeitrisiken unspezifischer Immunsuppressiva wie dem erhöhten Tumorrисiko sowie spezifischer Risiken wie der Kardiotoxizität des am häufigsten verwendeten Mitoxantron muss die Anwendung dieser Therapeutika sorgfältig abgewogen werden.

Sowohl immunmodulatorische als auch immunsuppressive Substanzen beeinflussen die entzündlichen Prozesse der Erkrankung. Die schleichende Progression neurologischer Ausfallscheinungen bei der chronisch progredienten Form der MS wird durch diese Maßnahmen nur gering beeinflusst. In diesen Stadien der Erkrankung bestimmt vor allem der zunehmende Axonverlust die Progression (Trapp et al., 1998). Es gibt bisher keine etablierten medikamentösen Therapien, die die Krankheitsprogression maßgeblich beeinflussen.

Immunpathogenese der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

Die EAE ist eine entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des ZNS, die aufgrund vieler Ähnlichkeiten zur MS als Tiermodell der MS angesehen wird. Die EAE kann in suszeptiblen Tierstämmen durch Immunisierung mit Myelin-Antigenen oder den Transfer von Myelin-Antigen spezifischen T-Zellen induziert werden. Der klinische Verlauf ist abhängig vom Modell akut-monophasisch, schubförmig oder chronisch. Klinisch ist er meist durch eine

aufsteigende Lähmung der Extremitäten gekennzeichnet, auf die eine spontane Remission folgt.

Eine Vielzahl aufgereinigter oder rekombinanter Myelin-Proteine können nach subcutaner oder intradermaler Immunisierung mit kompletten Freundschen Adjuvans eine EAE auslösen, wie z.B. das Myelin Basische Protein (MBP) (Ben-Nun et al., 1981), das Proteolipid-Protein (PLP) (Sobel et al., 1986), das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) (Linington et al., 1993), das Myelin assoziierte Protein (MAG) (Weerth et al., 1999) oder das Astrozyten Protein S100 (Kojima et al., 1994). Eine ausgeprägte demyelinisierende Antikörperantwort wird besonders durch MOG in Ratten (Adelmann et al., 1995; Johns et al., 1995), Meerschweinchen (Lebar et al., 1986; Linington and Lassmann, 1987) und Krallenaffen (*Callithrix jacchus*) (Genain et al., 1995) induziert.

Die EAE kann auch durch den adoptiven Transfer von aktivierten T-Zellen ausgelöst werden, die spezifisch für das Myelin-Antigen sind und in der Regel vom Th1-Typ sind. Diese Zellen stammen aus immunisierten Donatoren. Sie werden *in vitro* mit dem entsprechenden Antigen restimuliert und intravenös oder intraperitoneal zur Induktion der EAE den Empfängertieren verabreicht.

Die Suszeptibilität von Tierstämmen gegenüber verschiedenen enzephalitogenen Antigenen wird vom MHC-Klasse-II-Lokus bestimmt (Steinman, 1992), und von anderen MHC- und nicht-MHC-Molekülen beeinflusst (Baker et al., 1995; t Hart et al., 2001).

Eine monphasische EAE kann in Lewis-Ratten durch eine Immunisierung mit Myelin Basischem Protein (MBP) oder dem enzephalitogenen MBP-Peptid (AS 68-88) im kompletten Freund'schen Adjuvans ausgelöst werden (Wekerle et al., 1994).

Viele Eigenschaften der humanen MS sind besonders bei der MOG-induzierten EAE der DA-Ratte wiederzufinden, wie der relapsierende klinische Verlauf oder die Bildung großer, konfluenter, demyelinisierter Plaques mit einer Verteilung, die der in der MS ähnelt (Probert et al., 2000).

Aktuelle Vorstellungen zur Immunpathogenese entzündlicher, demyelinisierter Läsionen

Zu Beginn der aktiv induzierten EAE, bei der mit Myelinbestandteilen zusammen mit komplettem Freund'schem Adjuvans (CFA) immunisiert wird, steht die Aktivierung von dendritischen Zellen, die das enzephalitogene Antigen in die sekundären Lymphorgane transportieren wo myelinspezifische, autoreaktive CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Effektorzellen

aktiviert und differenziert werden. Die enzephalitogenen T-Zellen zirkulieren danach in den Blutgefäßen, und eine relative kleine Zahl dringt letztendlich über die Bluthirnschranke ins ZNS ein, erkennt dort das von ZNS-residenten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) präsentierte Zielantigen und initiiert die Sekretion proinflammatorischer Zytoskeletale und Chemokine. Dadurch kommt es zum sekundären Einstrom weiterer T-Zellen und anderer Effektorzellen, zur Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia sowie zum Integritätsverlust der Bluthirnschranke u.a. durch die Aktivität von Matrixmetalloproteininasen. Sowohl durch die phagozytische Aktivität der Effektorzellen, bedingt durch lösliche Effektorformmoleküle, wie IFN- γ , TNF α , LT α oder Sauerstoffradikale, als auch durch Antikörper und Komplementaktivierung (Storch et al., 1998; Svensson et al., 2002) kommt es dann abhängig vom Tiermodell zu mehr oder weniger ausgeprägten Demyelinisierungen (Übersicht in Abb.1).

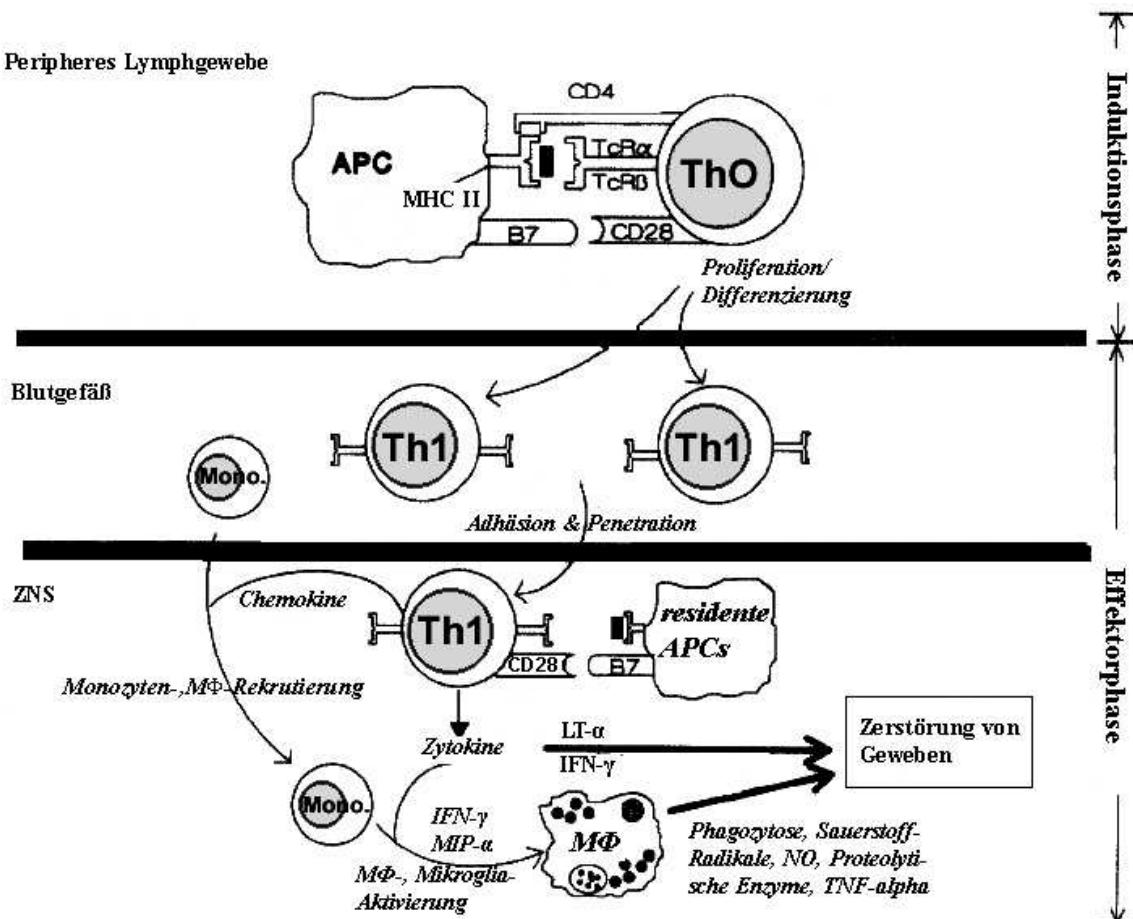


Abbildung 1: Übersicht über die Pathologie der EAE. In der Initiationsphase folgt der Aktivierung von T-Zellen in den in peripheren Lymphorganen deren Proliferation und Differenzierung zu Th1-Effektorzellen, die in der Lage sind, die Bluthirnschranke zu passieren und dort durch die Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren den Nachstrom von anderen Leukozyten zu veranlassen und residente APCs zu aktivieren. Durch Phagozytose und die Ausschüttung von Effektorformmolekülen, wie z.B. Antikörpern, Sauerstoffradikalen oder proteolytischen Enzymen kommt es in der Effektorphase zu Demyelinisierungen sowie dem Untergang von Oligodendrozyten und Neuronen (geändert nach (Miller and Shevach, 1998)).

Die Mechanismen der Remission sind nicht vollständig bekannt (Suvannavejh et al., 2000). U.a. tritt eine Verschiebung von einem proinflammatorischen Th1-Zytokinmilieu zu einem antiinflammatorischen Th2-Milieu auf (Di Rosa et al., 1998; Kennedy et al., 1992). Ebenfalls wurde die vermehrte Sekretion des immunregulatorischen Moleküls TGF β mit der Herunterregulation der akuten Schübe in Zusammenhang gebracht (Swanborg, 2001). Ein weiterer Faktor bei der Remission ist die Apoptose von CD4 $^{+}$ -Effektorzellen, die unter anderem von Mitgliedern der Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (TNFSF) ausgelöst wird (Bonetti et al., 1997; White et al., 1998). Wahrscheinlich erliegen die meisten aktivierten T-Zellen im ZNS vermutlich der Apoptose (Gold et al., 1997).

Ein Faktor, der für die Auslösung erneuter Schübe eine Rolle spielen könnte, ist das so genannte *Epitop-Spreading* (Tuohy et al., 1999). Das heißt, dass die Immunantwort im Verlauf der EAE gegen zusätzliche, weniger dominante Epitope aus demselben Antigen (intramolekular) oder gegen Epitope anderer Myelinantigene (intermolekular) gerichtet ist.

Die Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (TNFSF)

1975 wurde aus Makrophagen-Kulturen ein löslicher Faktor isoliert, dessen Fähigkeit, bei Tumoren die Nekrose auszulösen, ihm den Namen Tumor Nekrose Faktor (TNF) verlieh (Carswell et al., 1975). Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und viele andere Zellen produzieren TNF als Antwort auf Entzündungen, Verletzungen oder Infektionen (Baud and Karin, 2001). Dabei wird TNF nicht konstitutiv, sondern nur nach Induktion durch z.B. LPS; IL-1, IL-3, GM-CSF, IFN γ (oder TNF selbst) produziert.

Der Tumor Nekrose Faktor ist ein typischer Vertreter einer großen Familie von Zytokinen, die mit membranständigen Rezeptoren interagieren, die zur Tumor Nekrose Faktor Rezeptor-Familie gehören (TNFSFR). Verschiedene Mitglieder induzieren Apoptose, Proliferation, Überleben oder die Differenzierung von Zellen. Bei den Rezeptoren handelt es sich um Typ I Transmembranproteinene, die zwei bis sechs so genannte Cystein-reiche, extrazelluläre Domänen (CRDs) haben (Ashkenazi and Dixit, 1998). Zumindest einige der Rezeptoren der TNF-Rezeptor Familie autoaggregieren auch in Abwesenheit der Liganden, was zur Bildung von homologen Trimeren führt. Vermittelt wird dies über einen ebenfalls konservierten Bereich in der extrazellulären Domäne, der am N-Terminus lokalisiert ist, als PLAD (pre-ligand-binding assembly domain) bezeichnet wird und für die Funktionalität der Rezeptoren essentiell ist (Chan et al., 2000; Papoff et al., 1999).

Die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie haben generell keine intrinsischen katalytischen Eigenschaften. Deshalb benötigen sie Adaptermoleküle aus dem Zytoplasma, um ihre Funktionen vermitteln zu können. Basierend auf der Struktur dieser zytoplasmatischen Domäne, können die Rezeptoren der TNF-Superfamilie in zwei Gruppen eingeteilt werden (Locksley et al., 2001). Diejenigen, die eine so genannte Todesdomäne (Death Domain (DD)) tragen, werden Todesrezeptoren (Death Receptors) genannt. Bei der DD handelt es sich um ein konserviertes Motiv der zytoplasmatischen Domäne, die über Protein-Protein-Interaktionen den apoptotischen Signalweg einleiten kann. Unter den Todesrezeptoren befinden sich neben TNFR1 noch FAS, die sogenannten Death Rezeptoren sowie der NGF-Rezeptor. Die Rezeptoren ohne Todesdomäne nutzen TNF-Rezeptor-assozierte-Proteine (TRAFs) als Adapterproteine zur Signalweiterleitung. Diese Gruppe der Rezeptoren weist keine Homologien im intrazellulären Bereich auf, und sie unterscheiden sich stark in ihren Funktionen. Bei ihnen handelt es sich z.B. um den TNFR2, Fn14, den Lymphotoxin- β -Rezeptor oder CD30.

Die Liganden der TNF-Superfamilie sind, abgesehen von Lymphotoxin α (LT α oder TNF β), Typ II Transmembranproteine (Armitage, 1994). Sie kommen entweder membranständig oder als lösliche Proteine vor, die durch Metalloproteininasen prozessiert wurden (Idriss and Naismith, 2000; Kayagaki et al., 1995). Beide Varianten sind z.B. bei TNF, LT α oder CD40L bioaktiv (Jones et al., 1989; Karpas et al., 1995). Allerdings gibt es auch Moleküle, wie z.B. den FasL, bei denen Aktivitätsunterschiede zwischen der membranständigen und der löslichen Form bestehen (Shudo et al., 2001).

Eine Vielzahl von Prozessen wird von Liganden der TNF-Superfamilie vermittelt, wie z.B. Proliferation, Apoptose, Nekrose oder Zelldifferenzierungen (Tracey and Cerami, 1993; Vandebaele et al., 1995). Der Tumor Nekrose Faktor (TNF) reguliert z.B. proinflammatorische Immunantworten, die Zelldifferenzierung oder Umbauprozesse von Geweben in einer Vielzahl von Spezies (Adashi et al., 1990). Die meisten Liganden der TNF-Superfamilie werden von Zellen des Immunsystems exprimiert (Zhai et al., 1999).

Da für viele Mitglieder der TNFSF unterschiedliche Namen existieren – z.B. wurde BAFF (B cell activating factor) auch Blys, THANK oder TALL-1 genannt – wurde kürzlich eine systematischere Nomenklatur entwickelt, die auf der folgenden Internetseite zu finden ist: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/tnftop.html> (HGNC Gene Family Nomenclature).

TNFSF vermittelte Apoptose

Die Rezeptoren, die eine DD tragen, initiieren die Apoptose durch die Rekrutierung von Adaptormolekülen. Dabei kommt es zuerst durch Bindung des trimeren Liganden zu einer Trimerisierung des Rezeptors sowie der Todesdomänen, zu denen die FADD-Moleküle (Fas-associated death domain) rekrutiert werden – entweder direkt an die Todesdomänen oder über weitere Adaptormoleküle, den TRADD-Molekülen (TNF-receptor associated death domain Protein) (Kischkel et al., 1995). Es folgt die Anlagerung der Initiatorkaspasen-8, die durch die Oligomerisierung autoproteolytisch aktiviert werden (Muzio et al., 1998). Entweder direkt durch die Aktivierung der Apoptose auslösenden Effektor-Kaspase-3 oder indirekt über einen mitochondrien-abhängigen Mechanismus initiiert die Kaspase-8 die Apoptose. Beim indirekten Weg bewirkt die Kaspase-8 zuerst eine Spaltung von Bid (BH3-Interacting domain death agonist), einem Mitglied der Bcl-2 Proteinfamilie bewirkt (Li et al., 1998), woraufhin das carboxyterminale Spaltprodukt von Bid (tBid) die Freisetzung von Zytochrom C aus den Mitochondrien auslöst. Zusammen mit Apaf-1 (apoptosis Protease activating factor-1) und der Prokaspase-9 bildet es das sogenannte Apoptosom (Wang, 2001), das ebenfalls die Kaspase-3 aktiviert (Wieder et al., 2001). Die Mitochondrien setzen neben dem Zytochrom C auch proapoptotische Moleküle frei, wie AIF (apoptosis inducing factor), Smac/DIABLO sowie einige Prokaspasen, die notwendig für die irreversible Einleitung der Apoptose zu sein scheinen (Du et al., 2000; Loeffler and Kroemer, 2000; Lorenzo et al., 1999; Verhagen et al., 2000). Es wird vermutet, dass jede Zelle das Potenzial hat, beide Apoptosewege einzuschlagen, und letztendlich die Menge an aktiver Kaspase-8 entscheidend ist, welcher Weg eingeschlagen wird. Verschiedene Todesrezeptoren prozessieren die Kaspase-8 unterschiedlich stark und lösen so unterschiedliche Apoptosewege (Wajant et al., 2003).

TNFSF vermittelte Aktivierung von NF-κB

Als NF-κB bezeichnet man dimere Transkriptionsfaktoren, die nach Zellstimulation vom Zytoplasma in den Kern wandern (Ghosh et al., 1998). Säugerzellen exprimieren fünf NF-κB Proteine. Als reife Proteine werden p65/RelA, c-Rel und relB synthetisiert. P50 und p52 entstehen durch proteolytische Spaltung aus Vorläuferformen (Ghosh et al., 1998). Normalerweise liegt NF-κB als inaktives Protein im Zytoplasma vor, das mit seinem Inhibitor IκBα komplexiert ist. Zur Aktivierung wird IκBα durch den IκBα Kinase Komplex (IKK) phosphoryliert, was dessen Ubiquitylierung und nachfolgenden Abbau bewirkt. Das freie

NF-κB kann in den Zellkern eindringen und die Transkription seiner Zielgene aktivieren (Maniatis, 1997). Der entscheidende Schritt für die Aktivierung von NF-κB ist die Regulation der Interaktion zwischen NF-κB und IκBα.

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF-κB ist neben der Induktion der Apoptose eine der wichtigsten Prozesse, die von Mitgliedern der TNF-Superfamilie vermittelt werden. Die Signalweiterleitung erfolgt dabei über die Rekrutierung von TRAF Molekülen (TNFR-associated factors), von denen sechs verschiedene identifiziert wurden, die jeweils an unterschiedliche TNF Rezeptoren binden. Die Rekrutierung von TRAF2, TRAF5 und TRAF6 führt zur Aktivierung von NF-κB (Aggarwal, 2003). IKK lagert sich an den Komplex aus TRAF und TNF Rezeptor an. Durch RIP (receptor interacting protein), das sich ebenfalls im TNF-Rezeptorkomplex befindet, wird die Interaktion zwischen TRAF und IKK stabilisiert, durch die es zur Aktivierung von IKK kommt, der dann wiederum IκBα phosphoryliert und NF-κB freisetzt.

Die Aktivierung von NF-κB bewirkt u.a. einen Schutz vor der Apoptose, da sich unter den Zielgenen, deren Transkription durch NF-κB induziert wird, sich Gene befinden, die die Zelle vor der Apoptose schützen (Wang et al., 1998).

Neben der Aktivierung von NF-κB aktivieren einige Mitglieder der TNF-Superfamilie auch c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK), die ebenfalls einen Einfluß auf die Zellproliferation, Differenzierung oder Apoptose haben (Chang and Karin, 2001), aber auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird.

Mitglieder der TNF-Familie und Autoimmunkrankheiten des ZNS

Viele Liganden der TNF-Superfamilie beeinflussen die Pathogenese der EAE. So stellt die Produktion von TNFα (TNFSF2) und LTα (TNFSF1) eine charakteristische Eigenschaft enzephalitogener T-Zellen dar (Powell et al., 1990); Antikörper gegen diese beiden Moleküle verhindern die durch adoptiven Transfer ausgelöste EAE (Ruddle et al., 1990). Andererseits führte eine systemische Inhibition von TNFα in Patienten mit einer progressiven Form der MS zu einer Aktivierung des Immunsystems und zu einer Erschwerung der Krankheit (van Oosten et al., 1996). TNFα-knockout-Mäuse hatten eine schwerere Erkrankung mit ausgedehnterer Demyelinisierung (Liu et al., 1998), was auf eine immunsupprimierende Funktion von TNFα hindeutet. Zudem löst es genauso wie andere TNF-Familienmitglieder die Apoptose in aktivierten T-Zellen aus und kann so zur Einleitung der Remission beitragen (Bachmann et al., 1999). Die Blockade von Lymphotoxin-alpha (LTα) führte in mehreren

Studien zu einer Verminderung der Krankheitssymptome (Gommerman et al., 2003; Probert et al., 2000; Suen et al., 1997).

Der Fas Ligand (FasL, CD95L, TNFSF6) wird auf der Zelloberfläche aktiverter T-Lymphozyten exprimiert. Er kann bei Kontakt mit dem Fas Rezeptor (CD95) (Nagata and Golstein, 1995) unter anderem auch in Oligodendrozyten Apoptose auslösen und zur Läsionsentstehung beitragen (Dittel et al., 1999). Der FasL ist jedoch auch an der Remission beteiligt, indem er zur Entfernung von autoreaktiven Lymphozyten beiträgt. Aktivierte T- und B-Zellen exprimieren neben FasL auch vermehrt Fas auf ihrer Oberfläche, die auf der gleichen Zellen exprimiert miteinander interagieren und so Apoptose auslösen können (White et al., 2000). Die Induktion von FasL-Autoantikörpern führte *in vivo* u.a. dazu, dass es nicht zu einer Remission kommt, weil die Apoptose der EAE-Effektorzellen verringert war (Wildbaum et al., 2000).

Der TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL, TNFSF10) wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und bindet an mehrere *Todesrezeptoren* (DR4 und DR5), an die beiden Decoy Rezeptoren (DcR2 und DcR3) und an das lösliche Osteoprotegerin (OPG). TRAIL vermittelt die Apoptose nur in Tumorzellen und spielt keine Rolle bei der Eliminierung von autoreaktiven Lymphozyten (Cretney et al., 2002; Walczak et al., 1999). Es ist noch wenig über die Rolle von TRAIL bekannt, aber mehrere Studien legen nahe, dass TRAIL Signale vermittelt, die eine protektive Funktion gegen Autoimmunkrankheiten haben (Hilliard et al., 2001; Song et al., 2000; Suter et al., 2003). Zudem scheint es noch einen Zusammenhang zwischen der Aufregulierung von TRAIL im Serum sowie auf T-Zellen und dem Ansprechen auf eine Interferon- β (IFN- β) Therapie bei MS-Patienten zu geben. Eine verstärkte TRAIL-Expression könnte zukünftig möglicherweise als klinischer Marker für einen Therapieerfolg mit IFN- β angesehen werden (Wandinger et al., 2003).

Auch von einigen Mitgliedern der TNF-Superfamilie, deren Rezeptoren nicht über die DD verfügen, ist bekannt, dass sie von großer Bedeutung für die Entwicklung der EAE sind. Der Rezeptor 4-1BB ist auf aktivierte T-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Die Gabe eines agonistischen 4-1BB Antikörpers kann die Apoptose von autoreaktiven T-Zellen fördern und so die EAE-Symptome verringern (Sun et al., 2002).

Der OX40 Ligand (OX40L, TNFSF4) wird auf aktivierte professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert und bindet OX40 (CD134), das auf T-Zellen nach Triggerung des T-Zellrezeptors induziert wird (Ndhlovu et al., 2001). Eine Verhinderung der Interaktion zwischen OX40 und seinem Liganden resultierte in einer Verminderung der EAE-

Symptome (Nohara et al., 2001; Weinberg et al., 1999); wahrscheinlich, weil die Infiltration von Effektorzellen in das ZNS verhindert wird.

Der TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Der **TNF-related weak inducer of apoptosis** (TWEAK, TNFSF12) ist ein 249 Aminosäuren umfassendes Typ II Membranprotein, dessen mRNA ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben, insbesondere in lymphoiden exprimiert ist (Wiley and Winkles, 2003). Das membranständige TWEAK-Protein konnte bisher nur auf der Oberfläche von mit IFN γ aktivierten Monozyten gefunden werden (Nakayama et al., 2000). Mit TWEAK-cDNA transfizierte Zellen exprimieren generell eine 18kDa große, lösliche Form des Proteins (Chicheportiche et al., 1997).

Bei dem TWEAK-Rezeptor, dem fibroblast growth factor-inducible protein 14 (Fn14, TNFSF12A), handelt es sich um ein Typ I Transmembranprotein, das 129 Aminosäuren groß ist und keine Todesdomäne beinhaltet (Wiley and Winkles, 2003). Fn14 mRNA wurde in vielen Geweben identifiziert, aber die Expression von Fn14 auf der Oberfläche wurde nur bei Fibroblasten (Meighan-Mantha et al., 1999), endothelialen (Harada et al., 2002; Lynch et al., 1999), Glioma- (Tran et al., 2003) und neuronalen Zellen (Tanabe et al., 2003) nachgewiesen. Fn14 führt zur Aktivierung von NF- κ B durch die Bindung der TRAF-Familienmitglieder 1,2,3 oder 5 (Brown et al., 2003) oder kann auch Apoptose auslösen (Nakayama et al., 2003). Weiterhin fördern TWEAK bzw Fn14 die Angiogenese (Wiley and Winkles, 2003), die Migration von endothelialen und Glioma-Zellen (Tran et al., 2003; Wiley et al., 2001) und die Induktion von proinflammatorischen Faktoren wie IL-6, IL-8, Matrixmetalloproteinase-1, RANTES (regulated on activation normal T expressed and secreted), IFN γ -inducible Protein 10 oder Prostaglandin E2 in Fibroblasten (Chicheportiche et al., 2002). Astrozyten produzieren als Reaktion auf eine Stimulation mit TWEAK IL-6, IL-8 sowie ICAM-1 (Saas et al., 2000) und Endothelzellen sezernieren CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) und IL-8 und regulieren ICAM-1 und E-selectin auf (Harada et al., 2002). Diese Daten legen nahe, dass die Aktivität von TWEAK an der Bluthirnschranke das Eindringen von Leukozyten ins ZNS fördern könnte.

Bei der EAE wurde eine Aufregulation von TWEAK-mRNA in Lymphknoten gefunden. Transgene Mäuse, die lösliches TWEAK in der Leber überexprimieren, zeigten eine signifikante Verschlechterung der EAE (Desplat-Jego et al., 2002). Die Gabe von

neutralisierenden TWEAK-Antikörpern verhinderte die Abstoßungsreaktion in einem Transplantations-Modell.

Auf neuronalen Zellen exprimiert, kann Fn14 nach Stimulation durch TWEAK die Apoptose initiieren (Potrovita et al., 2004), was belegt, dass TWEAK auch neurodegenerative Prozesse fördern könnte.

Neuere Erkenntnisse belegen, dass NF-κB durch TWEAK auch in Zellen aktiviert werden kann, die kein Fn14 auf der Oberfläche tragen. Dies deutet entweder auf einen zweiten bisher noch unbekannten TWEAK-Rezeptor (Polek et al., 2003) oder auf eine Rezeptor-unabhängige Internalisierung von TWEAK in die Zellen hin (De Ketelaere et al., 2004).

DNA-Vakzinierung

Mittels DNA-Vakzinierung können prinzipiell für ein natives Protein spezifische, funktionelle Antikörper erzeugt werden, indem DNA zur Vakzinierung eingesetzt wird, die für das jeweilige Protein kodiert.

Die intramuskuläre Injektion von Plasmid DNA generiert starke zelluläre und humorale Immunantworten für viele verschiedene Antigene in einer Vielzahl von Säugetierspezies (Donnelly et al., 1997). Der Mechanismus, mit dem es zur Aufnahme des Plasmids und zur

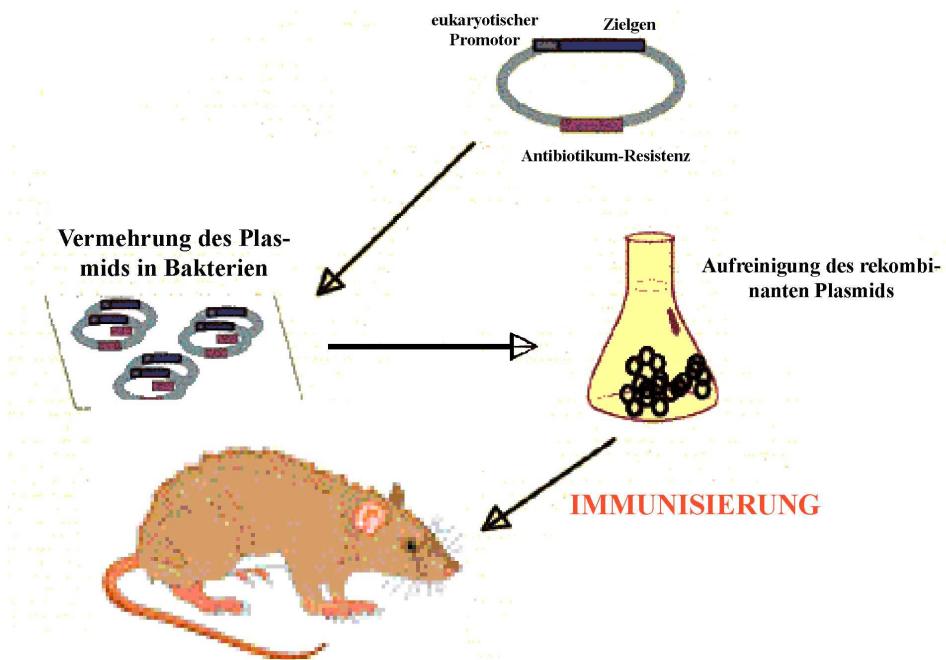


Abbildung 2: Schema der Vorbereitung einer DNA-Vakzinierung bei Ratten

Expression des Proteins kommt, ist noch nicht vollständig verstanden. Die Stärke der Immunantwort hängt generell vor allem vom Antigen und weniger von dem verwendeten Vakzinierungsvektor. Die Vorteile der DNA-Vakzinierung gegenüber einer konventionellen Immunisierung mit einem Protein bestehen darin, dass die Aufreinigung und Handhabung von Plasmiden bedeutend unkomplizierter als von Proteinen sind sowie dass die aus der Plasmid-Injektion resultierenden Proteine korrekt gefaltet sind (Donnelly et al., 2003).

Die Plasmide, die für die DNA-Vakzinierung verwendet werden, beinhalten normalerweise nur ein Gen für einen Selektionsmarker, einen starken viralen Promotor, einen Replikationsstartpunkt und eine Polyadenylierungssequenz (Montgomery et al., 1994).

Zur Herstellung der DNA-Vakzine wird die kodierende Sequenz für das Antigen, gegen das eine Immunantwort initiiert werden soll, in das Vakzinierungsplasmid *kloniert*, im großen Maßstab (im mg Bereich) produziert und aufgereinigt. Die Plasmidlösung wird dann mehrmals intramuskulär oder auch subdermal injiziert (Abb.2). Der Erfolg der Vakzinierung wird überprüft, indem die lokale Expression des Antigens mittels RT-PCR lokal an der Injektionsstelle überprüft und zweitens, indem ca. zwei Wochen nach der letzten Vakzinierung im Serum mittels ELISA nach entsprechenden Antikörpern gesucht wird. Die Detektion des exprimierten Antigens mit antikörperbasierten Tests, wie WesternBlot oder ELISA ist wegen der zu geringen Sensitivität äußerst schwierig, da die Menge von Antigenen die mit dieser Methode produziert werden, sehr gering ist (Chastain et al., 2001).

Die DNA-Vakzinierung wurde zur Erforschung der Rolle von verschiedenen Molekülen in der EAE bereits eingesetzt. Es war dabei in der Regel das Ziel, Antikörper für die jeweiligen Moleküle zu induzieren, die zu deren Blockade *in vivo* führen sollte. So wurden z.B. Antikörper gegen FasL in Lewis-Ratten induziert, die offenbarten, dass FasL sowohl zur Pathogenese der EAE als auch zur Terminierung der EAE beiträgt (Wildbaum et al., 2000). Eine ähnliche Strategie im gleichen Tiermodell wurde gewählt, um die Rolle von CCL2 und CCL1 (früher: MIP1 α (macrophage inflammatory protein 1-alpha)) in der EAE zu untersuchen. Dabei wurde gezeigt, dass beide Moleküle zur Entwicklung der EAE beitragen, und dass deren Neutralisierung durch antagonistische Antikörper, die mittels DNA-Vakzinierung induziert worden waren, die EAE vermindert (Youssef et al., 1999).

DNA-Mikroarrays

Ein Mikroarray ist eine sehr dichte Anordnung von Molekülen wie z.B. Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Proteinen auf einer festen Oberfläche. Im Gegensatz zu

den Protein- oder Laborchips befinden sich die DNA-Chips bereits in sehr breiter und allgemeiner Anwendung. Bei dieser Technologie wird die Eigenschaft einzelsträngiger Nukleinsäure-Moleküle genutzt, nur bei Vorliegen einer komplementären Sequenz spezifisch aneinander binden (hybridisieren) zu können. Die sehr hohe Selektivität der Hybridisierung ermöglicht sehr genaue Analysen. Seit dem Ende der achtziger Jahre wird dafür weltweit an der Entwicklung von Herstellungs- und Anwendungsverfahren für die so genannte DNA-Chiptechnologie gearbeitet, die ihre besonderen Vorteile in der extrem hohen Miniaturisierung und der damit einhergehenden Parallelisierung hat, wodurch bei jedem Experiment eine sehr umfangreiche Menge an Daten kreiert wird.

Als Sonden werden DNA-Moleküle mit definierten Sequenzen in einem Array auf einem soliden Träger fixiert, bei dem es sich entweder um einen Filter oder um beschichtete Glas- oder Kunststoffoberflächen handelt. Zu diesem DNA-Array werden die zu untersuchenden Nukleinsäure-Proben gegeben, die zur späteren Detektion beispielweise mit einem

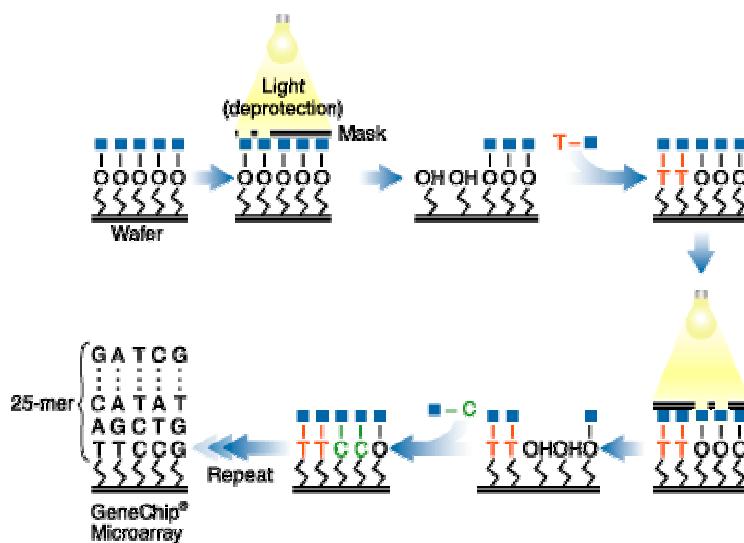


Abb. 3: Photolithographische Herstellung von Oligonukleotidarrays. (<http://www.affymetrix.com>)

Fluoreszenzfarbstoff versehen wurden. Eine Hybridisierung der DNA aus der Probe mit den trägergebundenen Sensormolekülen kann durch ein Fluoreszenzsignal an der entsprechenden Position innerhalb des Arrays detektiert werden (Hardiman, 2002). Die Signalintensität erlaubt dabei auch die Quantifizierung der entsprechenden Gene in der Probe (Hoheisel and Vingron, 2000).

Die DNA-Chips können auf unterschiedliche Weise hergestellt werden. Sehr verbreitet ist die photolithographische Herstellung, bei der die Sonden lichtgesteuert direkt *in situ* erstellt werden (Abb.3). Ansonsten werden die Sonden konservativ hergestellt und auf verschiedenen Wegen auf die Chipoberfläche aufgebracht (Ramsay, 1998).

Zur Erstellung von Expressionsprofilen muss zunächst aus dem biologischen Material, zum Beispiel einem Tumor oder in unserem Fall dem ZNS-Gewebe, die mRNA isoliert werden.

Die isolierte mRNA-Population, wird enzymatisch in eine doppelsträngige cDNA umgeschrieben, aus der wiederum eine cRNA durch *in vitro*-Transkription gewonnen wird, in die biotinylierte Nukleotide zur Makierung eingebaut werden. Die modifizierten cRNA-Moleküle binden im Hybridisierungsschritt spezifisch an die auf dem Array vorhandenen komplementären Oligonukleotiden. Ungebundene cRNA-Moleküle, die keine komplementären DNA-Fragmente auf dem Array finden, werden bei den anschließenden Waschschritten entfernt, woraufhin die gebundenen mit Streptavidin-Phycoerythrin markiert. Schließlich wird der Mikroarray in einem Scanner ausgemessen, indem der Phycoerythrin-Farbstoff durch Laserlicht angeregt und die Fluoreszenz in den verschiedenen Sektoren, die den bekannten Genfragmenten entsprechen, detektiert und quantifiziert wird. Die Fluoreszenz-Intensitäten, die mit den verschiedenen Genfragmenten assoziiert sind, sind ein sehr präzises Maß für die Menge der im Ausgangsmaterial vorhandenen mRNA-Moleküle. Um die Expressionsdaten von verschiedenen Proben vergleichbar machen zu können, werden sie nach dem Einlesen normalisiert. Mittels geeigneter DataMining-Software können anschließend unterschiedlich regulierte Gene identifiziert werden.

Aufgabenstellung

In der hier durchgeführten Untersuchung wurden zwei Wege zur Identifizierung neuer molekularer Ansatzpunkte der Multiplen Sklerose Therapie und ihrer Evaluierung im Tiermodell beschritten.

Im ersten Teil der Arbeit sollte der Einfluss der zwei TNF-Familienmitglieder FasL und TWEAK für den Krankheitsprozeß der EAE zu untersucht werden. Durch die Induktion von neutralisierenden Autoantikörpern gegen diese beiden Moleküle sollte ihre Rolle in der MOG-induzierten EAE von DA-Ratten determiniert werden. Als Methode zur Antikörperinduktion wurde die Vakzinierung mit einem für das jeweilige Molekül kodierende DNA-Konstrukt ausgewählt. Eventuelle Resultate sollten durch histologische und zellbiologische Untersuchungen untermauert werden. Da sich im Verlauf der Untersuchungen zeigte, dass die DNA-Vakzinierung nicht zur Bildung von Antikörpern gegen die betreffenden Moleküle führte, wurde die Methode der Antikörper-Induktion auf die konventionelle Immunisierung mit rekombinanten Proteinen umgestellt. Studien mit dem Ziel, die Produktion von Antikörpern, ihre neutralisierenden Kapazität *in vitro* sowie ihre Effekte auf den klinischen Verlauf der EAE auf die histopathologischen Befunde nachzuweisen, sollten folgen.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurde parallel unter Benutzung von Affymetrix-DNA-Mikroarrays eine Expressionsstudie in der MOG-induzierten EAE der DA-Ratte durchgeführt. Hauptziel war es, durch Analyse differentiell regulierter Gene während der akuten oder chronischen Phase der EAE neue mögliche Zielmoleküle für die Therapie der Multiplen Sklerose zu identifizieren.

Für diese Studie sollten Ratten, die sich entweder in der akuten Phase der EAE, der Remission oder der relapsierenden Phase befanden, sowie gesunde Ratten ausgewählt und die aus dem ZNS gewonnene RNA für die Hybridisierung der DNA-Chips verwendet werden. Die anschließende Auswertung der Rohdaten sollte mit speziellen Array-Auswertetools wie *dchip 1.3*, *GeneCluster 2.0* oder *GenMapp 2.0* ausgeführt werden und die Ergebnisse mittels RealTime-PCR oder wenn möglich mittels Protein basierten Methoden bestätigt werden. Der Nachweis der pathologischen Relevanz und der möglichen Bedeutung als therapeutisches Zielmolekül sollte dann in ausgewählten Fällen durch geeignete Ansätze wie z.B. der Applikation eines Agonisten oder Antagonisten im Tiermodell erfolgen.

Material und Methoden

Verwendete Materialien

Chemikalien und Reagenzien

100bp-DNA ladder	GIBCO (Invitrogen), Karlsruhe
1kb-DNA ladder	GIBCO (Invitrogen), Karlsruhe
[³ H] Thymidin	Amersham Biosciences, München
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Merck KgaA, Darmstadt
Aluhydrogel	Brenntag Biosector, Dänemark
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
APS	Sigma-Aldrich, München
Astrozyten Zelllinie CTX TNA2	LGC Promochem, Wesel
β-Mercaptoethanol	Life Technologies, Großbritannien
BIOCOAT® Zellkulturgefäße	BD Biosciences, Heidelberg
B-Per Reagence	Perbio Systems, Bonn
Cardiotoxin	Latoxan, Frankreich
Cell Strainer	BD Biosciences, Heidelberg
Coomassie brilliant blue G250	BioRad, München
Des-Arg ⁹ ,Leu ⁸ -Bradykinin	Bachem, USA
DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM/F12-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
DryEase Mini Cellophane-Membranen	Invitrogen, Karlsruhe
ECL ^{plus}	Amersham Biosciences, München
EGM-2a-Medium	Cambrex BioScience, Belgien
ELISA Platten Nunc MaxiSorp	Nalgene Nunc International, Wiesbaden
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Fn14:Fc	Apotech, Schweiz
FCS	Biochrom, Berlin
Genetycin (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin	Life Technologies, Großbritannien
Glycin	Merck KgaA, Darmstadt

H37Ra (Mycobacterium tubercolis)	BD Biosciences, Heidelberg
Harnstoff	Sigma-Aldrich, München
HEPES	Life Technologies, Großbritannien
Humanes TWEAK	Biosource Int, USA + Peprotech, USA
Humanes basisches FGF	R&D Systems, USA
HUVEC Endothelzelllinie	Clonetics, USA
Igipal	Sigma-Aldrich, München
Imidazol	Biomol, Hamburg
IPTG	Biomol, Hamburg
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München
Kapillaren zur Blutentnahme	K+K Laborbedarf
Kollagenbeschichtete Zellkulturgefäße	BD Biosciences, Heidelberg
LB-Medium	BD Biosciences, Heidelberg
LF 16-0687 Ms	Fournier Pharma, Daix, Frankreich
Lipofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
Lysing Matrix D (Aufschlussröhrchen)	Q Biogene, Heidelberg
MAGIC-Proteinstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Mark12-Proteinstandard	NOVEX (Invitrogen), Karlsruhe
MOG-Peptid (AS 35-55)	BIG Biotech, Freiburg i.B.
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nitrozellulose Membran	Schleicher&Schuell, Freiburg
Nunclon Mikrotiterplatten	Nunc, Dänemark
Paraformaldehyd	Merck KgaA, Darmstadt
p-Nitrophenylphosphate (p-NPP)	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/ Streptomycin	GIBCO (Invitrogen), Karlsruhe
Pertussis Toxin	Hoffmann La-Roche, Penzberg
PLP (139-151)	Dr. J Pineda Antikörper-Service, Germany
Precision plus-Proteinstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Printed Filtermat B	Wallac, Finnland
RNAlater	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	Hoffmann La-Roche, Penzberg
RPMI 1640	GIBCO (Invitrogen), Karlsruhe
SeaBlue-Proteinstandard	NOVEX (Invitrogen), Karlsruhe

Material und Methoden

SnakeSkin Dialysis Tubing	Perbio Systems, Bonn
T-Per Reagence	Perbio Systems, Bonn
Tris-Base+ Tris-HCl	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Merck KgaA, Darmstadt
TOP10 (kompetente Zellen)	Invitrogen, Karlsruhe

24G connector (Hamilton, 86509, FEM. HUB, GA24, 50mm) zur Suspendierung von MOG bzw. PLP

Puffer und Medien

10x PBS

NaCl	1,37M (80g/l)
KCl	27nM (2g/l)
Na ₂ HPO ₄	100mM (14,2g/l)
NaH ₂ PO ₄	100mM (13,8g/l)
pH 7,4 mit NaOH	

Harnstoff-Lysis-Puffer

Harnstoff	8M (480g/l)
NaH ₂ PO ₄ -1H ₂ O	0,1M
Tris-HCl (pH8.0)	10mM

Elutionspuffer

50x TAE für DNA-Elektrophorese

Imidazol	0,5M (34,04g/l)
gelöst in Harnstoff-Lysis-Puffer	

Tris	242g/l
Na ₂ EDTA (pH8)	50mM (18,6g/l)
Eisessig	57,1ml/l

4x Sammelgel-Puffer (SDS-PAGE)

11 0,1M Natriumhydrogenphosphat-Puffer (pH8,0)

0,2M NaH ₂ PO ₄ -1H ₂ O	5,3ml
0,2M Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	94,7ml

6% Polyacrylamid in 125mM Tris
3,75mM SDS
1% APS
1% TEMED, pH 6,8

4x Trengel-Puffer (SDS-PAGE)

15% Acrylamid in 125mM Tris
3,75mM SDS

Material und Methoden

1% APS		<u>Coomassie-Färbelösung</u>
1,5% TEMED, pH 8,8		
<u>Laufpuffer (SDS-PAGE)</u>		10% (v/v) Essigsäure 0,006% (w/v) Coomassie brilliant blue
0,05M	Tris	
0,38M	Glycin	<u>LB-Agarplatten</u>
0,004M	SDS, pH 8,3	LB-Medium mit 1,5% Agarose
<u>5x Probenpuffer (SDS-PAGE; Laemmli)</u>		
<u>RPMI1640 (für LNC-Kultur)</u>		
250mM	Tris-HCl	
20%	Glycerin	450ml RPMI 1640
8%	SDS	50ml FCS
0,04%	Bromphenolblau	1mM Natriumpyruvat
20%	Mercaptoethanol, pH 6,8	2mM Glutamin 50µM β-Mercaptoethanol
<u>Blotting Puffer</u>		
3,5g/l	Tris-Base	15mM HEPES
14,1g/l	Glycin	100 U/ml Penicillin
20%	Methanol	100 µg/ml Streptomycin
<u>DMEM/F12 Medium für RBE4-Zellen</u>		
<u>4% PFA (w/v)</u>		
40g PFA in 0,5l	70°C heißes Wasser gelöst	500ml DMEM/F12
+ 1ml 10M NaOH	Filtration	1ng/ml humanen, basischem FGF
+ 0,5l 0,2M NaPO ₄ -Lösung		450µg/l Genetycin (G418)
<u>RIPA-Puffer</u>		
<u>10x DNA-Auftragspuffer</u>	NaCl	150mM
	Igipal	1%
25% Ficoll 400	Natrium-Deoxycholat	0,5%
0,25% Bromphenolblau	SDS	0,1%
0,25% Xylencyanol	Tris, pH7,5	50mM

Kits

TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems, USA
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System...	Hoffmann La-Roche, Penzberg
Rapid DNA Ligation Kit	Hoffmann La-Roche, Penzberg
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Mab Trap™ -Kit	Amersham Biosciences, München
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
GelCode®6xHis Protein Tag Stain Reagent Set	Perbio Systems, Bonn
QIAwell 8 Ultra Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
EndoFree Plasmid Giga Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR-Kit	Qiagen, Hilden
BD OptEIA Rat MCP-1 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA Human MCP-1 ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Superscript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe
High Yield RNA Transcript Labeling Kit	Enzo Life Sciences, USA
Gene Chip Rat Genome U34 Arrays	Affymetrix, Großbritannien

Antikörper

Mouse anti-Actin Monoclonal Antibody	Chemicon, Großbritannien
Mouse anti-rat CD3 clone (G4.18)	Research Diagnostics, USA
Mouse anti-human TWEAK (CARL-1)	eBioscience, USA
Rabbit anti TWEAK (FL-249)	Santa Cruz Biotechnology, USA

Geräte

Gigafuge	Hereaus GmbH, Hanau
Biofuge pico	Hereaus GmbH, Hanau
GenePulser	BioRad, München
Äkta Prime Chromatographie System	Amersham Biosciences, München

Power Pack 300	BioRad, München
Alpha-RVC Rotations-Vakuum-Konzentrator	Christ GmbH, Osterode im Harz
Fast Prep 110	Qbiogene, Heidelberg
Photometer Ultraspec 2000	Amersham Biosciences, München
Storm 860 Phosphoimager	Amersham Biosciences, München
E ^{max} Microplate Reader	Molecular Devices, Großbritannien
ABI 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Semidry Transfer-Blotting-Kammer	Biorad, München
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Waldbronn
G2500A GeneArray Scanner	Agilent Technologies, Waldbronn
TOMTEC cell harvester	Wallac, Finnland
Topcount Scintillation Counter	Wallac, Finnland
Minigelsystem	Hoefer, USA

Vektoren bzw. Plasmide

MOG-pQE12

Der Vektor zur Produktion von rekombinanten MOG (AS 1-125, in Expressionvektor pQE12 (Qiagen)) wurde freundlicherweise von C.Linington (Max Planck Institut für Neurobiologie, Martinsried) zur Verfügung gestellt (Amor et al., 1994).

pQE60

Bei dem pQE60 Vektor von Qiagen handelt es sich um einen prokaryotischen Expressionsvektor, der auf den pDS56/RBSII Plasmiden basiert. Die pQE Vektoren sind low-copy Plasmide, die über einen Phage T5 Promotor und zwei *Lac*-Operator-Sequenzen sowie eine synthetische Ribosomenbindungsstelle verfügen, so dass die Transkription und Translation effizient verlaufen und zudem durch den *Lac*-Repressor stringent reguliert werden können. Am 3'-Ende der *Multiple Cloning Site* befindet sich ein 6x-His-Tag kodierender Bereich, der dafür sorgt, dass ein His-Tag an den C-Terminus des Proteins *angehängt* wird, um die Aufreinigung des Proteins über Ni-NTA-Chromatographie zu ermöglichen. Die positiven Klone können nach der Transformation durch die vom Plasmid kodierte β -Lactamase, die eine Ampicillin-Resistenz vermittelt, selektiert werden (Abbildung 4).

pVax1

Der Vektor pVax1 von Invitrogen besitzt einen CMV-Promotor (cytomegalovirus immediate-early promotor), der für eine starke Expression in Säugetieren sorgt sowie eine BGH (bovine growth hormon) Polyadenylierungsstelle, die der effizienten Terminierung der Transkription dient. Er wird in *E.coli* vermehrt und trägt deswegen zur Selektion ein Gen, das eine Kanamycin-Resistenz vermittelt (Abbildung 5).

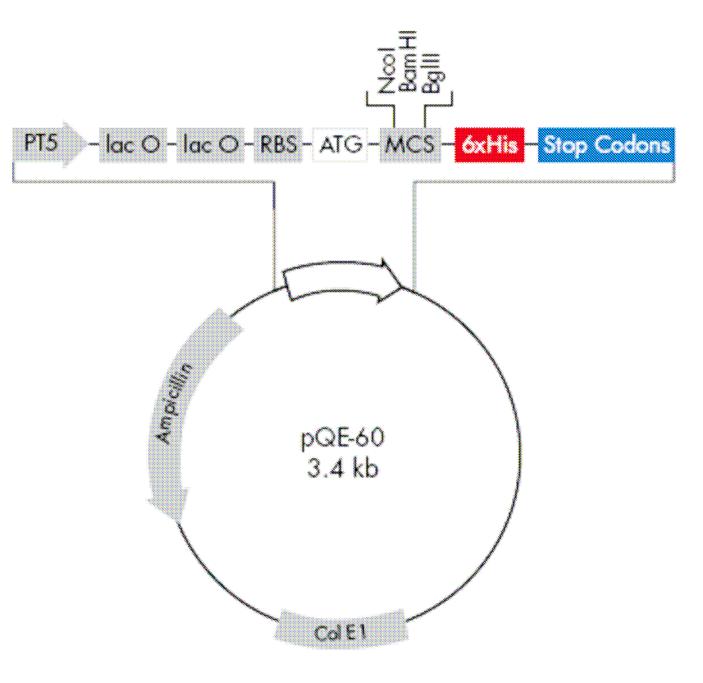


Abbildung 4: Aufbau des prokaryotischen Expressionsvektor pQE60 der Firma Qiagen

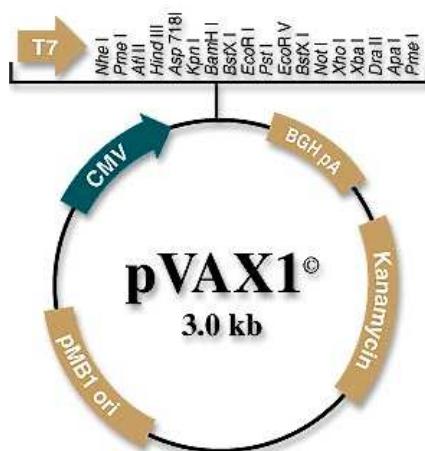


Abbildung 5: Übersicht über den eukaryotischen Expressionsvektor pVax1 (Invitrogen)

pCR4Blunt-TOPO

Invitrogen, Karlsruhe

Software

Scion Image Version Beta 4.02	Scion Corporation, USA
Sigma Stat 3.0	SPSS GmbH Software, München
Sigma Blot 8.0	SPSS GmbH Software, München
dchip 1.3	Harvard University, USA
NetAffx	Affymetrix, Großbritannien
EASE (Expression Analysis Systematic Explorer)	National Institute of Health, USA
GeneCluster 2.0	MIT, GenomeResearch Cent, USA
BRB ArrayTools 3.2	National Institute of Health, USA
GenMapp 2.0	Conklin Lab, San Francisco, USA
MS Office	Microsoft, Seattle, USA
PhotoShop 7.0	Adobe Systems, Seattle, USA

Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolierung

Nach der Entnahme der Gewebe für die RNA-Isolierung, wurden diese in RNAlater über Nacht bei 4°C inkubiert und danach bis zur RNA-Isolierung bei –80°C eingefroren.

Gesamt RNA aus Geweben wurde mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) isoliert. Homogenisiert und aufgeschlossen wurden die Gewebe dafür mit Hilfe des Fast Prep 110-Geräts und der *Lysing Matrix D* im Puffer QIAzol (Qiagen). Ansonsten wurde das Protokoll des Produzenten befolgt (<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/INT/rnalit.aspx>).

Die Qualität der isolierten RNA wurde in der Regel durch eine Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Bei intakter RNA sollten zwei scharfe Banden für die 18S und 28S rRNA bei Eukaryoten im Gel erkennbar sein, die ca. 80% der Gesamt-RNA ausmachen. Die Konzentration der mRNA wurde photometrisch bei 260nm bestimmt. Danach wurde die RNA aliquotiert und bei –80°C gelagert.

cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des Reverse Transcription Systems revers transkribiert (<http://www.promega.com/tbs/tb099/tb099.html>). Generell wurden polyT-Primer verwendet, wenn die cDNA für Klonierungen verwendet werden sollte, und Random

Oligohexanukleotide, wenn sie für Expressionsanalysen mittels RealTime-PCR gedacht waren.

Polymerase Kettenreaktionen (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur DNA-Amplifikation. Bei der Durchführung der PCRs wurde prinzipiell das Expand High Fidelity PCR System verwendet. Dabei wurden die Primer für Klonierungen so konzipiert, dass dem PCR-Produkt eine Restriktionsschnittstelle angehängt wurde, mit der es sich mittels *StickyEnd-Ligation* in den jeweiligen Vektor einfügen ließ.

Die Primerpaare, die für eine RealTime-PCR eingesetzt wurden, wurden so gewählt, dass das bei der PCR entstehende Produkt eine Länge von ungefähr 100bp hatte und dass jeweils Exon-Grenzen überspannt wurden, um eine Amplifikation von möglicherweise vorhandener genomischer DNA zu vermeiden.

Restriktionsverdau

Der für die Klonierungen nötigen *Verdau* von Plasmiden und PCR-Produkten wurden bei 37°C entweder für 1-2 Stunden oder über Nacht durchgeführt. Alle verwendeten Restriktionsenzyme und Puffer stammten von der Firma New England Biolabs (Frankfurt/M).

Agarose-Gelelektrophorese

Um Nukleinsäuren anhand ihres Molekulargewichts aufzutrennen, wurden Gelelektrophoresen mit 1%-1,5%igen Agarosegelen durchgeführt. Dazu wurde Agarose in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen, nach einer kurzen Abkühlphase 3µl Ethidiumbromid/100ml zugegeben und das Gel in die vorbereiteten Gelkammern gegossen. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 10x DNA-Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 10V/cm Gellänge und wurde jeweils mittels einer Digitalkamera dokumentiert.

Gelelution

Zur Elution von DNA wurde das QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend der Anweisung des Herstellers verwendet (<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/INT/cleanlit.aspx>).

Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte mittels Spektralphotometrie. Dabei wurde die Absorption von Nukleinsäuren bei 260nm gemessen. Eine optische Dichte (OD) von eins entspricht dabei 50mg/ml dsDNA oder 40mg/ml RNA.

Ligation

Zur Herstellung von Vakzinierungs- bzw. Expressionsvektoren wurden generell *verdaute* PCR-Produkte mit entsprechend *verdauten* Vektoren mit überstehenden Enden (sticky end) ligiert. Dabei wurde das Rapid DNA Ligation Kit verwendet. Der Ansatz war wie folgt: In 8 μ l wurden Insert und Vektor im Verhältnis 3:1 bis 5:1 miteinander vermischt. Nach der Zugabe von 2 μ l des 5 x DNA-Verdünnungspuffer, 10 μ l DNA-Ligationspuffer und 1 μ l T4-DNA-Ligase wurde die Ansätze für 5min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Transformation

Die Plasmide wurden zur Vermehrung und Kontrolle in den chemisch kompetenten *E.coli*-Stamm XL1 Blue (TOP10) mittels Hitzeschock transformiert. Dafür wurden 10 μ l des Ligationsansatz zu 50 μ l kompetenten Zellen gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem Hitzeschock bei 42°C für 60sec transformiert. Zur Regeneration wurden sie dann für 45min bei 37°C mit 400ml LB-Medium ohne Selektionsmittel geschüttelt und anschließend auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

Die fertigen prokaryotischen Expressionsplasmide wurden mittels Elektroporation in den *E.coli*-Stamm M15 (Qiagen) transformiert, der eine T5-RNA-Polymerase exprimiert und das Plasmid pREP4 besitzt, das für den Lac-Repressor kodiert und zusätzlich eine Kanamycin-Resistenz vermittelt. Jeweils ~10ng des jeweiligen Plasmids gelöst in 6 μ l Wasser wurden mit einem 20 μ l Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis für 20min inkubiert und mittels Elektroporation bei 2,5V und 200W transformiert. Anschließend wurden die Zellen mit 400ml LB-Medium bei 37°C ohne Selektionsdruck regeneriert und auf LB-Platten (100 μ g/ml Ampicillin, 25 μ g/ml Kanamycin) ausplattiert.

Plasmidisolation

Die Präparation kleiner Plasmidmengen aus *E.coli* diente ausschließlich analytischen Zwecken. Die jeweiligen Klone wurden dafür in 4ml LB-Selektionsmedium *gepickt* und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Plasmidisolation erfolgte mit dem QIAwell 8 Ultra Plasmid Kit entsprechend den Angaben, die auf der Homepage des Herstellers zu finden sind: (<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/INT/plkkit.aspx>).

Für die Präparation von Plasmiden zur Sequenzierung und Transformation wurde das HiSpeed Plasmid Midi Kit benutzt. Im Unterschied zum MiniPrep wurden dafür 100ml Selektionsmedium über Nacht inkubiert.

Sehr große Mengen an Plasmid-DNA wurden für die DNA-Vakzinierung benötigt. Aus dem Grund wurden die Plasmide mit dem EndoFree Plasmid Giga Kit aus 2,5l Selektionsmedium isoliert. Damit konnten, ausreichend große DNA-Mengen für die Vakzinierungen gewonnen werden (bis zu 10mg DNA pro Isolierung).

Kolonie-PCR

Diese Art der PCR diente der Analyse der Klonierungsergebnisse. Dabei wurden Klone von der Selektionsplatte isoliert und in 50µl demineralisiertem Wasser resuspendiert, das als Template in einer PCR eingesetzt wurde. In der ersten Denaturierungsphase des PCR-Programms (15min) kam es dann nicht nur zur Denaturierung der DNA, sondern auch zu einem Zellaufschluß, wodurch die Nukleinsäuren freigesetzt wurden. Als Primer wurden Oligonukleotide eingesetzt, die an die Ränder der Multiple Cloning Site des jeweiligen Plasmids banden. Bei einer erfolgreichen Klonierung muss das PCR-Produkt so lang sein wie die Multiple Cloning Site des Vektors plus dem jeweils eingebauten Fragment.

Sequenzierungen

Die Sequenzierungen der Vakzinierungs- und Expressionsplasmide führte die Firma Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) durch.

Klonierungsansätze

Eine Übersicht über die für die Klonierungen verwendeten Primern befindet sich in Tabelle 1. Die cDNA, die als Template verwendet wurde, stammte aus der Milz von DA-Ratten.

FasL

Die Sequenz, die für den Fas Liganden kodiert, wurde in den eukaryotischen Expressionsvektor pVax1 und in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE60 *hineinkloniert*. Für die Erstellung des Vakzinierungsvektors wurden das entsprechende PCR-Produkt sowie der Vektor pVax1 vor der Ligation mit BamHI und NheI verdaut.

Bei der Herstellung des Plasmids für die rekombinante Proteinsynthese wurden der Vektor und das PCR-Produkt mit BglII und NcoI verdaut.

TWEAK

Das PCR-Produkt für das Vakzinierungskonstrukt wurde zuerst in den pCR4Blunt-TOPO Vektor *subkloniert* und daraus mit NheI und NotI herausgeschnitten und mit dem ebenfalls entsprechend geschnittenen Vektor pVax1 *ligiert*.

Für die Expression des rekombinanten TWEAK-Proteins wurde nur der Teil der kodierenden Sequenz amplifiziert, der der extrazellulären Domäne des Proteins entspricht. Das entspricht den Aminosäuren 95-249. Nach der PCR wurden das Produkt der PCR sowie pQE60 vor der Ligation mit BglII und NcoI verdaut.

Fn14

Die kodierende Sequenz von Fn14 wurde ausschließlich in den Vektor pQE60 zur Expression des rekombinanten Proteins kloniert. Die Ligation wurde hierbei ebenfalls durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen NcoI und BglII vorbereitet.

Gen	Sense	Antisense
FasL-pVax1	NNN GCT AGC ATG CAG CAG CCC GTG AAT TAC CCA TGT	NNN NGG ATC CCC AAG CTT ATA TAA GCC AAA AAA G
FasL-pQE60	NNN NCC ATG GGT GCA GCA GCC CGT GAA TTA CC	NNN NAG ATC TAA GCT TAT ATA AGC CAA AAA
TWEAK-pVax1	GCG GAT CCA NCA TGG CCG CCC GTC GGA GCC AG	NNN NGC TAG CTC AGT GAA CTT GAA GAG TCC
TWEAK-pQE60	NNN NCC ATG GGC AGT GTT TCT AAA GGC CGG AAG GC-3'	NNN NAG ATC TGT GAA CTT GGA AGA GTC CAA AGT AGG TAA
Fn14-pQE60	5-NNN NNN CCA TGG CTC CGG GTT GGC CGC GGC CT	NNN NNA GAT CTC TGG ATC AGT GCC ACA CCT GG

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primer bei den Klonierungen

Produktion von rekombinanten Proteinen

Expression der Protein

200ml einer LB-Vorkultur (100 μ g/ml Ampicillin, 25 μ g/ml Kanamycin) wurden mit einem *E.coli* M15-Klon inkokuliert, der über das entsprechende Expressionsplasmid verfügte. Am nächsten Morgen wurde 2,5l des gleichen Selektionsmediums mit der Vorkultur beimpft und in einem 5l-Schikanekolben inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,7 erreicht worden war. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte daraufhin durch die Zugabe des Induktors des Lac-Operon IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid (c=1mM)). Für 4-6h wurden die Zellen bei 37°C weiterinkubiert. Mittels Zentrifugation (4°C, 8000g, 10min) wurden die Zellen geerntet.

Extraktion und Reinigung

Die Extraktion der rekombinanten Proteine erfolgte mit dem B-Per Reagenz entsprechend den Vorgaben des Herstellers (<http://www.piercenet.com/files/0736lea-4.pdf>). Da der Hauptteil der rekombinanten Proteine unlöslich als *Inclusionbodies* in der Zelle vorlag, wurden diese dem Protokoll entsprechend aufgereinigt und alle vorher gesammelten Extrakte aufgrund der deutlich geringeren Proteinkonzentration verworfen.

Zur Reinigung wurden die *Inclusionbodies* in 50 ml Harnstofflysis-Puffer gelöst und für 1h bei 4°C mit 5ml Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic Acid) Agarose inkubiert, die spezifisch Proteine mit einem His-Tag bindet, der normalerweise aus sechs bis acht Histidin-Resten besteht und an den C-Terminus sämtlicher von mir exprimierten Proteine angehängt ist. Danach wurde die Suspension in eine 10ml Säule überführt, mit 30ml Harnstofflysis-Puffer gewaschen und mit 15ml Elutionspuffers zu Fraktionen von jeweils 2,5ml eluiert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteine wurden sie mittels einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Da sämtliche exprimierten Proteine relativ klein waren (<40kDa), wurden dafür 15%ige SDS-Acrylamid Gele verwendet. Die Zusammensetzung war wie folgt:

	Trenngel (15%) [ml]	Sammelgel (5%) [ml]
Wasser	2,3	1,57
4x Puffer	2,5	0,83

Material und Methoden

Acrylamid	5	0,53
10% SDS	0,1	0,033
Ammoniumpersulfat 10% (w/v)	0,1	0,033
TEMED	0,013	0,004

Tabelle 2 Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben mit Laemmli-Probenpuffer gemischt, für 5min bei 95°C denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt.

Die Elektrophorese fand mit dem BioPack 300- und im Hoefer-Minigelsystem in der Regel bei 150V sowie einer Stromstärke von 30mA pro Gel statt.

Detektion der rekombinanten Proteine

Zur Detektion der aufgetrennten Proteine im Polyacrylamid-Gel wurde einerseits das GelCode®6xHis Protein Tag Stain Reagent Set verwendet, das spezifisch Proteine mit einem His-Tag färbt. Das Vorgehen entsprach dabei der Beschreibung des Herstellers (<http://www.piercenet.com/files/0870dh4.pdf>).

Nach der His-Tag Färbung wurden die Proteine, die sich auf dem Gel befanden, durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel für 1h bei RT in der Coomassie-Färbelösung geschüttelt und anschließend mit 10%iger Essigsäure entfärbt. Zur Archivierung wurden die Gele in DryEase Mini Cellophane-Membranen getrocknet.

Dialyse

Da sich die Proteine nach der Aufreinigung noch in dem Harnstoff-Lysis-Puffer befanden, wurden sie in sechs Konzentrationsschritten mit einem SnakeSkin-Dialyseschlauch, der eine Ausschlussgröße von 3,5kDa hatte, bei 4°C gegen PBS dialysiert.

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Eine Eichreihe einer BSA-Stammlösung im Bereich von 0 – 2mg/ml in einem Volumen von 20µl wurde erstellt, und entsprechende Volumina der zu messenden Proben vorgelegt. Nachdem die Proben mit demineralisiertem Wasser auf 800µl aufgefüllt worden waren, wurden sie mit 200µl unverdünnter Bradfordlösung versetzt, 15min bei RT inkubiert (Bradford, 1976) und bei einer Wellenlänge von 595nm im Photometer vermessen. Die Proteine wurden zu jeweils 1mg aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Analytische Methoden

Western Blot zur Bestimmung der Proteinexpression

Zur Quantifizierung von CD3- und MOG-Protein im Rückenmark von DA-Ratten und SJL/J-Mäusen wurden die bei -80°C gelagerten Gewebe in dem Proteinpuffer T-Per aufgeschlossen und dessen Proteine entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert (<http://www.piercenet.com/files/0848as4.pdf>). In einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel wurden sie nach der Größe aufgetrennt und aufgrund der, durch das SDS verliehenen negativen Ladungen, in einer Semidry Transfer Zelle auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte bei einer maximalen Leistung von 5W für 30min.

Die Membran wurde anschließend mit einer Blockierlösung blockiert, die in der Regel aus PBS mit 5% (w/v) Milchpulver und 3% (w/v) BSA bestand. Danach wurde sie zur Detektion des gewünschten Proteins mit einem dafür spezifischen Antikörper inkubiert, die in PBS verdünnt worden waren, dem zur Verhinderung unspezifischer Interaktionen zwischen den Antikörpern und der Membran 3% (w/v) Magermilchpulver und 1% (w/v) BSA zugesetzt wurden. Nach einer Inkubation von ungefähr einer Stunde wurde die Membran mit PBS/Tween gewaschen und mit einem sekundären Antikörper inkubiert, der für den Primären spezifisch und mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Nach einem weiteren Waschschnitt wurde die Membran mit dem Substrat ECL^{plus} für 5min inkubiert. Die Proteinbanden konnten die Proteine anschließend mit dem Phosphoimager STORM860 und der Auswertesoftware ImageQuant detektiert und quantifiziert werden.

Zur Standardisierung wurde in einem zweiten Hybridisierungsschritt auch die Menge des Haushaltsproteins β Aktin auf der Membran bestimmt. Die Membranen wurden dazu zuerst *gestripped* – das heißt, dass die an der Membran anheftenden Antikörper durch eine Lösung denaturiert wurden – und anschließend mit Antikörpern zur β Aktin-Detektion inkubiert. Die gemessenen Proteinkonzentrationen wurden dann generell ins Verhältnis zu β Aktin gesetzt. Durch diese Standardisierung wurde es ermöglichte, die Ergebnisse von verschiedenen Blots miteinander zuvergleichen.

RealTime-PCR

Zur Quantifizierung der Expression verschiedener Gene, entweder zur Bestätigung von Microarray Expressionsergebnissen oder zur Bestimmung der CD3-Expression im Rückenmark der verschiedenen Behandlungsgruppen, wurden RealTime-PCRs mit dem QuantiTect SYBR Green PCR-Kit durchgeführt. Die Quantifizierung basiert auf einer softwaregestützten Berechnung eines Fluoreszenzschwellenwertes (Threshold). Der Zyklus, in dem die zu untersuchende Probe diesen *Threshold* überschreitet, wird als *Cycle Threshold* (C_t) der jeweiligen Probe bezeichnet. Je mehr Zielsequenzen sich zu Beginn der PCR in der Probe befanden, umso eher wird der *Threshold* überschritten. Die Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich des der Probe zugewiesenen C_t -Wertes mit den Werten, die in parallel amplifizierten DNA-Standards ermittelt wurden. Bei den DNA-Standards handelte es sich um cDNAs, die vorher aus Milzen von Ratten hergestellt worden war. Die Expression der Gene wurde generell vierfach bestimmt.

Ähnlich wie bei der Quantifizierung der Expression mittels WesternBlot wurden auch diese Expressionsdaten auf β Aktin bezogen, um sie zu standardisieren und vergleichbar zu machen. Das bedeutet, dass bei allen Proben neben dem zu untersuchenden Gen auch die Expression von β Aktin bestimmt worden ist.

Gen	Sense	Antisense
Aktin	TAG GCA CCA GGG TGT GAT GGT	CAT ATC GTC CCA GTT GGT TAC GG
SLPI	TCC CAT TCG TGG ACC AGT GAA GAA	TGC CAT CAC ACT GGC CGT CAT TCT
MOG	TAC AAC TGG CTG CAC CGA AGA CT	AGG CTT TCC TTC GCT CCA GGA AGA
DORA	GAG ATA TGT GGA AAC AAG TCA TCA GC	AAG TCA GCA CAT CTA TGG TCT TCC A
GPNMB	AGG ATT CCA TCT ACA ATT GTG ATG GT	CCT AGT CCC TCT TTA ATG CCT ACT
BAFF	TCC TGC TAC TCC GCT GGC AT	GTC GTC TCC GTT CCG TGA AA
CXCL13	TTT TCT GGA CCA AGG CCA AGA	GGA GCT TGG GGA GTT GAA GTA
IRF-1	CAA GGA GGA ACC AGA GAT CGA CA	TAG AGT TGC CCA GCA GGG TGT C
CXCR4	TAT TAC GTG GGG ATC AGC ATC GAT T	AAG TCC GTT GTC ACC TTC TTC CG

Tabelle 3: Sequenzen der für RealTime-PCR verwendeten Primer

Gesamtcholesterin-Bestimmung im Ratten ZNS

Zur Extraktion von Lipiden und Lipoproteinen wurden Rückenmarks-Proben von EAE-Ratten in RIPA-Puffer mit Ultraschall homogenisiert. Vor der Bestimmung des Gesamtcholesterin-Gehalts mit dem Cholesterin-Quantifizierungskit *CHO 015* wurden die Extrakte mit dem RIPA-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 1mg/ml verdünnt. 100 μ l der Extrakte wurden in einer Mikrotiterplatte mit 5 μ l des Testreagenz versetzt und für 10min bei 37°C inkubiert.

Die Bestimmung der Cholesterinkonzentration erfolgte dann bei einer Wellenlänge von 540nm im *Mikroplate Reader*.

Histopathologische Untersuchungen

An Tag 20 nach der EAE-Induktion wurden SJL/J-Mäuse mit eiskalter, isotonischer (0,9%iger) Kochsalzlösung gefolgt von einer 4%igen Paraformaldehydlösung (PFA) zur Gewebefixierung perfundiert und deren Rückenmärker isoliert. Diese wurden dann über Nacht bei 4°C in PFA postfixiert, am nächsten Tag in drei Teile geschnitten (zervikal, thorakal und lumbosakralen) und in Paraffin eingebettet. Von jedem der drei Rückenmarksabschnitte wurden jeweils fünf Schnitte, mit einem Abstand von 500µm mit Hämatoxilin-Eosin- (HE) gefärbt. In dieser Färbung werden saure Moleküle im Schnitt durch das Hämatoxylin gefärbt. Zellkerne erscheinen blau. Das Zytoplasma der Zellen, Kollagen und proteinhaltige Lösungen werden rot angefärbt. Häufungen von Zellkernen deuten auf inflammatorische Infiltrate, die aus das ZNS infiltrierenden Leukozyten bestehen.

Anschließend wurden die fünfzehn Schnitte jedes Tieres bezüglich der Flächenanteils der entzündlichen Infiltrate analysiert. Dazu wurden mit Hilfe der Scion-Image-Software sowohl die Gesamtfläche als auch die Fläche der Infiltrate bestimmt, ohne dabei die Gruppenzugehörigkeit des jeweiligen Schnitts zu kennen. Der Anteil der entzündlichen Fläche an der Gesamtfläche der Schnitte wurde wie folgt berechnet: (Fläche mit Infiltraten/ Gesamtfläche) x 100 (Hilliard et al., 2001).

Zellbiologische Methoden

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zur Zellernte wurden die verschiedenen Zellarten von den Kulturgefäßen mit Trypsin/EDTA abgelöst, für 10min abzentrifugiert und im entsprechenden Medium resuspendiert. Die Passage der Kulturen erfolgte je nach Dichte und Zellart in 1:3 bis 1:10 Verdünnungen.

Zum Einfrieren der Zellen wurde das Zellpellet nach der Ernte in 2ml normalem Kulturmedium resuspendiert und mit 2ml eines zweifach Einfriermediums (übliches Kulturmedium mit 40% FCS und 20% DMSO) gemischt. Je 1ml wurde in ein Einfrierröhrchen gegeben und in einer Styroporbox über Nacht bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden die Röhrchen am nächsten Tag in einen Behälter mit flüssigen Stickstoff überführt.

Proliferationsassay mit Lymphknotenzellen (LNC)

Zur Bestimmung, ob die TWEAK-DNA-Vakzinierung Einfluss auf die primäre T-Zellantwort nimmt, wurden den Ratten am Tag 10 nach der EAE-Induktion die Lymphknoten entnommen, um Zellen daraus in Kultur zu bringen. Dabei wurden sie zuerst in RPMI1640-Medium mit steriles Werkzeug aufgeschnitten und durch ein Sieb gepresst. Anschließend erfolgte die Pelettierung der Zellen mittels Zentrifugation (4°C, 1000rpm, 10min). In einer 96well Mikrotiterplatten mit u-förmigen Böden (Nunclon) wurden 4×10^5 Zellen/well in jeweils vier parallelen Ansätzen mit variierenden Konzentrationen des rekombinanten MOG für 4d inkubiert. Für die letzten 24h wurde den Kulturen [³H] markiertes Thymidin hinzugefügt (0,5 μ Ci/well). Die Ernte der Zellen geschah mit dem Tomtec cell Harvester und Membranen der Sorte *Printed Filtermat B*. Die eingebaute Radioaktivität wurde, nachdem die Filter für mindestens 1h bei ~50°C getrocknet worden waren, mit einem Szintillationszähler gemessen.

Ein entsprechender Versuch wurde mit dem B₂-Inhibitor LF 16-0687 Ms und mit PLP aktivierten LNCs von SJL/J durchgeführt, bei dem ebenfalls 4×10^5 Zellen/well für vier Tage inkubiert wurden. LF 16-0687 Ms wurde so zugesetzt, dass sich Konzentrationen von 0 - ~24 μ g/ml ergaben. An Tag drei der Inkubation wurde wiederum jedem Ansatz [³H] markiertes Thymidin (0,5 μ Ci/well) zugegeben.

CCL2-Assays (MCP-1)

Für die Analyse der CCL2-Produktion durch Astrozyten wurde die Ratten- Zelllinie CTX TNA2 benutzt. Dabei wurden 5×10^4 Zellen/well in einer unbeschichteten 24well-Platte mit DMEM-Medium ohne oder mit TWEAK (500ng/ml) kultiviert. Nach 24 und 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen und dessen CCL2-Produktion mit dem OptEIA Rat MCP-1 ELISA Set bestimmt (<http://www.bdbeurope.com/temp/129187.pdf>).

Die Bestimmung der CCL2-Produktion durch zerebrale Ratten Endothelzellen (RBE4-Zelllinie von Françoise Roux, Paris) nach 24h Inkubation mit 500ng/ml TWEAK wurde entsprechend durchgeführt (Kultivierung von 4×10^4 RBE4-Zellen/ well einer mit Kollagen beschichteten 24well Platte (BIOCOAT®-Platten)).

Zum Nachweis der TWEAK-Produktion nach einer Transfektion mit TWEAK-pVax1 wurden 20000 Astrozyten (CTX TNA2) pro well einer 24well Platte für 24h inkubiert, für 2,5h mit 0,3 μ g TWEAK-pVax1-DNA in 3 μ l Lipofectamin transfiziert und nochmals für 48h inkubiert.

Material und Methoden

Die Überstände wurden bei -20°C und die Zellen bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle wurden entsprechende Ansätze mit FasL-pVax1, pVax1, nur Lipofectamin sowie naiven Zellen durchgeführt. Die Transfektion erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (<http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/18324.pdf>). Als Messgröße für die TWEAK-Expression wurde die Induktion der CCL2-Produktion genommen, die mittels ELISA bestimmt wurde.

Neutralisationsassay: Von den Ratten, die mit Proteinen vakziniert worden sind, wurde sechs Wochen nach der zweiten Vakzinierung Blut entnommen, um daraus Antikörper zu isolieren. Das Gesamt-IgG aus den gepoolten Seren der einzelnen Gruppen wurde mit Hilfe von Säulen, die mit Protein G gekoppelter Sepharose gepackt waren, aus dem MabTrapTM-Kit gewonnen ([http://www1.amershambiosciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/148897217-B345/\\$file/71500343AD.pdf](http://www1.amershambiosciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/148897217-B345/$file/71500343AD.pdf)).

Zur Überprüfung der Funktionalität der Antikörper wurde deren Einfluss auf die TWEAK-induzierte Produktion des Chemokins CCL2 (monocyte chemoattractant Protein-1) von HUVEC-Zellen untersucht (Harada et al., 2002).

Humane Endothelzellen (HUVEC) wurden in einer Zelldichte von $10^5/\text{well}$ in mit Kollagen beschichteten 24 Well-Platten (BIOCOAT[®]) in $400 \mu\text{l}$ EGM-2a-Medium ausgesät. In Dreifach-Ansätzen wurden den HUVEC-Zellen entweder nur TWEAK (500ng/ml), TWEAK mit dem Gesamt-IgG von TWEAK-, Fn14- oder kontrollvakzinierten Tieren oder TWEAK mit einem Fn14:Fc-Konstrukt hinzugefügt und für 24h inkubiert. Zur Kontrolle wurden drei Ansätze nur mit EGM-2A-Medium ohne Zusätze kultiviert. Der CCL2-Gehalt in den Überständen wurde mit dem humanen MCP-1 ELISA-Kit bestimmt, ohne von den Anweisungen des Herstellers abzuweichen (<http://www.bdbeurope.com/temp/699987.pdf>).

Tierexperimentelle Methoden

Tiere

Alle im Verlaufe dieser Arbeit benutzten Tiere stammen von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchsen). Es wurden weibliche Dark agouti-Ratten (DA) und weibliche SJL/J-Mäuse verwendet. Alle Tierversuche fanden nach den Bestimmungen des Tierschutzrechts statt. Die Haltung der Tiere erfolgte in der offenen Haltung des Gebäudes H4 der Uniklinik Regensburg. Sie standen unter regelmäßiger tierärztlicher Kontrolle.

DNA-Vakzinierung

Zwei verschiedene Protokolle wurden zur DNA-Vakzinierung benutzt:

Zu Beginn wurde den DA Ratten 100 μ l Cardiotoxin [10mM] in den Muskel *Musculus tibialis* des linken Hinterbeins gespritzt. Die anschließende Regenerierung der geschädigten Myozyten soll die spätere Aufnahme der eukaryotischen Expressionsplasmide erleichtern (Lobell et al., 1998). Eine Woche später wurde den Tieren 100 μ l der jeweiligen Plasmidlösung mit einer Konzentration von 1mg/ml intramuskuläre injiziert und dies viermal in wöchentlichen Abständen wiederholt. Dabei erhielten die Versuchstiere das Plasmid pVax1, in das das Gen für FasL, Trail oder TWEAK hineinkloniert worden war, und die Kontrolltiere den leeren Vektor pVax1. Sechs bis acht Wochen nach der letzten Injektion wurde die EAE induziert.

Beim zweiten Protokoll wurde auf die Vorbehandlung des Zielmuskels mit Cardiotoxin verzichtet. Außerdem erhielten die Tiere die Vakzinierungsvektoren nur zweimal mit drei Wochen Abstand (Waisman et al., 1996).

Kontrolle der Transkription der Vakzinierungsansätze

Eine Woche nach der letzten DNA-Vakzinierung wurde aus jeder Gruppe ein Tier geopfert, um die Expression des injizierten Konstrukts mittels RT-PCR aus der cDNA des Muskelgewebes zu kontrollieren. Die Primer wurden so gewählt, dass sie die untranslatierte Region an den Rändern der Multiple Cloning Site banden. Wie bei der Kolonie-PCR ergab so die Länge des PCR-Produkts Auskunft über den Erfolg der DNA-Vakzinierung.

Primersequenz für die Kontrolle der DNA-Vakzinierung:

Sense: GTT TAA ACT TAA GCT TGG TAC CGA GCT CGG ATC-3'

Antisense: GTT TAA ACG GGC CCT CTA GAC TCG AGC-3'

Der Sense Primer bindet an den Vektor pVax1 an die Position 701 und der Antisense-Primer an die Position 952. Das bedeutet, dass das PCR-Produkt bei einer erfolgreichen Kontroll-Vakzinierung mit dem leeren pVax1-Vektor 251bp lang sein sollte. Bei den anderen Gruppen sollte das PCR-Produkt wegen der Sequenz, die in die Multiple Cloning Site *hineinkloniert*

Material und Methoden

worden ist, entsprechend größer sein – z.B. sollte es bei einer PCR mit einem Tier aus FasL-pVax1-vakzinierten Gruppe 918bp groß sein.

Die Kontrolle der TWEAK-DNA-Vakzinierung geschah mit anderen Primern:

Sense: CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA-3'

Antisense: TCA GAC AAT GCG ATG CAA TTT CCT CAT TTT A-3'

Der Sense Primer bindet bei TWEAK-pVax1 an die Position 657 und der Antisense-Primer an die Position 1603. Das bedeutet, dass das PCR-Produkt mit einem Tier aus der TWEAK-pVax1-Gruppe 946bp lang sein sollte.

ELISA zur Antikörperbestimmung

Mittels eines direkten ELISA wurden die Antikörpertiter gegen MOG, FasL und TWEAK bestimmt. Dafür wurde den Tieren zwei Wochen nach der zweiten Vakzinierung an der Schwanzvene (Ratte) oder aus dem retrobulbären Blutgefäßen (Maus) Blut entnommen. Das Serum wurde gewonnen, indem das Blut für 1h bei 4°C gerinnen konnte und dann abzentrifugiert wurde.

Zu Beginn der Antikörperbestimmung wurden die ELISA-Platten mit den rekombinanten Proteinen in PBS (c = 350ng/well in 200µl) über Nacht bei 4°C beschichtet. Für den TWEAK ELISA wurde statt des rekombinanten Ratten Proteins 50ng/well des humanen TWEAK (Peprotech) zur Beschichtung der Platten benutzt.

Als nächstes wurden die Platten dreimal mit PBS/Tween-20 gewaschen, und die Seren der behandelten Tiere in seriellen Verdünnungen von 1:50 bis 1:10⁵ in die Wells gegeben und für 2h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurde ein mit Alkaliphosphatase konjugierter sekundärer Antikörper hinzugefügt und ebenfalls für 2h inkubiert, die Platten wiederum gewaschen und für ungefähr 30 Minuten mit dem Substrat p-NPP inkubiert. Das Reaktionsendprodukt hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 405nm und wurde mit dem Mikroplatten-Reader E^{max} detektiert.

Protein-Vakzinierung

Zur Antikörperinduktion wurden DA Ratten und SJL Mäuse mit den rekombinanten Fn14- oder TWEAK-Proteinen vakziniert. Dabei wurde das Adjuvans Aluminiumhydroxid

Material und Methoden

(Aluhydrogel) verwendet, das zu einer Induktion einer starken Antikörperantwort führt (Wallberg et al., 2003). Die Tiere wurden intraperitoneal (i.p.) mit 100µl einer Vakzinierungslösung gespritzt, die zu 30% aus Aluminiumhydroxid und zu 70% aus dem jeweiligen Protein in PBS bestand. Nach nach drei Wochen erfolgte eine zweite Vakzinierung und nach weiteren zwei Wochen wurden Blut für die Bestimmung der Antikörpertiter entnommen.

Donor-SJL-Mäuse für die adoptive Transfer-EAE wurden genauso mit rTWEAKext bzw. dem Kontrollansatz immunisiert wie für die aktive EAE. Nach einer sechswöchigen Ruhephase nach der zweiten Vakzinierung und der Bestätigung des entsprechenden Antikörpertiters, wurden sie mit PLP-Peptid immunisiert. Deren LNCs 10 Tage später in Kultur gebracht und mit PLP restimuliert wurden. Nach vier Tagen wurden die restimulierten LNCs zur Krankheitsinduktion in naive SJL-Mäuse übertragen. Damit sollte festgestellt werden, ob die Proteinvakzinierungen einen Einfluss auf die Enzephalitogenität der LNCs hat.

EAE-Induktion und klinische Evaluation

Weibliche DA-Ratten wurden unter Narkose intradermal an ihrem Schwanzansatz mit 200µl einer Suspension des rekombinanten Ratten-MOGs (rMOG) immunisiert. Diese Suspension enthielt 65µg rMOG, 100µl inkomplettes Freund'sches Adjuvans (IFA) sowie 400µg hiteinaktivierter Mykobakterien (*Myc.t.*). Die Flüssigkeiten wurden mit 2 Spritzen, die durch einen 24G connector (Hamilton, 86509, FEM. HUB, GA24, 50mm) miteinander verbunden waren, solange vermischt, bis eine dicke Emulsion entstanden war (4-5 x 5min).

Weibliche SJL/J-Mäuse wurden s.c. mit einer Suspension des Proteolipid Proteins (PLP, 139-151 (NH_2 -HSLGKWLGH₂PDKF-CONH₂)) immunisiert, die 200µg PLP, 50% komplettes Freund'sches Adjuvans (CFA) und 500µg *Myc. t.* in 200µl enthielt.

Die Adoptive Transfer EAE (AT-EAE) wurde durch die Verabreichung von aktivierten, enzephalitogenen Lymphknotenzellen ausgelöst. Dabei wurden Donor-SJL-Mäuse mit PLP-Peptid wie beschrieben immunisiert. An Tag 10 wurden die Lymphknoten entnommen und die darin enthaltenden Zellen (LNCs) isoliert. Dafür wurden die Lymphknoten aufgeschnitten und mit einem Stößel durch ein steriles Nylonnetz mit 70µm Poren (Cell Strainer) gepresst. Die Zellen wurden für 4 Tage in RPMI 1640-Medium zusammen mit 10µg/ml PLP in unbeschichteten 24well Plates bei einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml kultiviert. Für

Material und Methoden

die Induktion der EAE wurden dann unbehandelten Empfängertieren $0,8 - 1 \times 10^7$ Zellen, suspendiert in $250\mu\text{l}$ PBS, intraperitoneal injiziert.

Der Verlauf der Krankheit wurde täglich ab Tag 6 nach EAE-Induktion beobachtet. Dabei wurden die Tiere gewogen und nach folgender Skalierung (incl. Zwischenschritte) eingeteilt:

- | | |
|---|--------------------------------------|
| 0 | Keine Krankheitssymptome |
| 1 | Schwanzlähmung |
| 2 | Schwächung der Hinterbeine |
| 3 | Lähmung der Hinterbeine |
| 4 | Lähmung mindestens eines Vorderbeins |
| 5 | Tot oder moribund |

Wenn die Tiere an drei aufeinander folgenden Tagen einen Schweregrad von vier oder mehr aufwiesen, wurden sie getötet. Tiere, die starben oder getötet werden mussten, erhielten für alle nachfolgenden Tage den klinischen Score von 5.

Applikation des Bradykinin Rezeptor 2 (B₂)-Inhibitor LF 16-0687 Ms in der adoptiven Transfer EAE

Die AT-EAE wurde wie oben beschrieben induziert. Beginnend am Zeitpunkt der Injektion der LNCs wurde den Tieren s.c. der B₂-Inhibitor LF 16-0687 Ms (1-[[3-[2,4-Dimethylquinolin-8-yl]oxymethyl]-2,4-dichlorophenyl]sulfonyl]-N-[3-[[4-(Aminoimino-methyl)-Phenyl]carbonyl-amino]propyl]-2(S)-pyrrolidinecarboxyamide Dimethylat Salz) injiziert (Ding-Zhou et al., 2003), der freundlicherweise von der Firma Fournier Pharma (Daix, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurde. Bis einschließlich Tag neun erhielten alle Tiere zwei Injektionen pro Tag und danach bis zum sechzehnten Tag eine Injektion. Ab dem siebzehnten Tag wurde die Injektion eingestellt, weil die zu dem Zeitpunkt verfügbare Menge des Inhibitors verbraucht war. Die Tiere wurden in drei Gruppen zu je zehn Tieren eingeteilt. Eine Gruppe erhielt jeweils 5mg LF 16-0687 Ms/kg Körpergewicht (100 μg /Maus) und eine zweite 2,5mg LF16-0687 Ms/kg Körpergewicht (50 μg /Maus), gelöst in 200 μl 0,9%iger Kochsalzlösung. Einer Kontrollgruppe wurde entsprechend die gleiche Menge der Kochsalzlösung ohne Inhibitor gespritzt.

Die Hemmung der Aufregulation der Bradykinin-1 (B₁)-mRNA durch die Anwendung des B₂-Rezeptor Inhibitors wurde kontrolliert, indem drei Mäusen ab dem 6.Tag nach Induktion

Material und Methoden

der AT-EAE Mäusen täglich 100 μ g LF 16-0687 Ms und weiteren drei Mäusen eine isotonische NaCl-Lösung s.c. injiziert wurde. Am zehnten Tag wurden die Tiere geopfert und Gewebe für eine RealTime-PCR entnommen. Die Menge der BK-1 mRNA wurde mit Hilfe des *Bradykinin receptor B1 expression assay* (Applied Biosystem assay ID: Hs00664201_s1) und dem *Euyarotic 18S rRNA endogenous control kit* (Applied Biosystem assay ID: 4319413E) in einer *multiplex RealTime-PCR* bestimmt.

Applikation des Bradykinin Rezeptor 1 (B₁)-Inhibitor (Des-Arg⁹,Leu⁸)-Bradykinin in der AT-EAE

Ab dem Zeitpunkt der Induktion der AT-EAE bei SJL/J-Mäusen bekamen zehn Mäuse dreimal täglich 200 μ l eine isotonische Kochsalzlösung des peptidbasierten B₁-Inhibitors (Des-Arg⁹,Leu⁸)-Bradykinin mit einer Konzentration von 0,33mg/ml intraperitoneal injiziert – zehn Kontrollmäuse erhielten wiederum die Kochsalzlösung.

Narkose der Tiere

Zur Blutentnahme oder zur Durchführung der verschiedenen Vakzinierungen wurden die Tiere, in einem Exsikkator liegend, mit 20% O₂, 70% N₂O und 4% Isofuran betäubt.

Die Narkose der Tiere vor der Perfusion erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion eines Narkotikums, bei dem es sich um Gemisch aus dem Schmerzmittel Fentanyl, dem Muskelrelaxan Metedomin und dem Schlafmittel Midazolam handelte.

Perfusion der Tiere

Für histopathologische Untersuchungen wurden narkotisierte Tiere zur Fixierung mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung perfundiert. Nach der Anästhesie erfolgte dafür die Öffnung des Brustkorbs. Mittels einer Kanüle, die in die linke Herzkammer gestochen wurde, wurden die Tiere erst mit kalter, 0,9%iger NaCl-Lösung und anschließend mit PFA perfundiert. Danach wurden das Rückenmark und das Gehirn präpariert.

Falls das Gewebe für die RNA- oder Protein-Isolierung gedacht war, wurden die Tiere nur mit der isotonischen Kochsalzlösung perfundiert und die Gewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Statistik

Die statistischen Analysen wurden, abgesehen von den Mikroarray-Experimenten, mit Sigma Stat 3.0 durchgeführt. Zum Vergleich der durchschnittlichen klinischen Scores sowie der entzündlich veränderten Rückenmarksanteile wurde ein Mann-Whitney-Test verwendet, während die CD3- und die Cholesterin-Mengen in den Rückenmärkern der DNA-vakzinierten DA-Ratten sowie die Expression von CXCR4 in den Lymphknoten jeweils mit einem t-Test verglichen wurden. Mit einem einseitigen ANOVA-Test, kombiniert mit dem Holm-Sidak Test, wurde die CCL2-Produktion der unterschiedlichen HUVEC-Behandlungsgruppen miteinander verglichen.

Expressionsanalyse mittels Affymetrix-Biochips

Verwendete Biochips

Für die Untersuchungen wurden die *GeneChip Rat Genome U34* Arrays benutzt, die aus drei einzelnen Chips bestehen, die mehr als 24.000 Gene repräsentieren, von denen ca. ein Drittel zum aktuellen Zeitpunkt bekannt sind, und der Rest aus ESTs (established sequence tags) zusammengesetzt ist.

Auswahl der Tiere

Für die Analyse der Expressionsveränderungen im Verlauf der EAE im Rückenmark von DA-Ratten wurden letztendlich dreizehn Tiere ausgewählt. Jeweils drei Tiere waren gesund, aus der ersten, akuten Phase der EAE (Tag 11 bzw. 12 nach Induktion der EAE) und aus der Remission (Tag 13, 14 nach EAE-Induktion). Vier Tiere befanden sich am Tag der Perfusion in der chronischen, relapsierenden Phase der EAE (Tag 24 bzw. 25 nach EAE-Induktion, Abbildung 6).

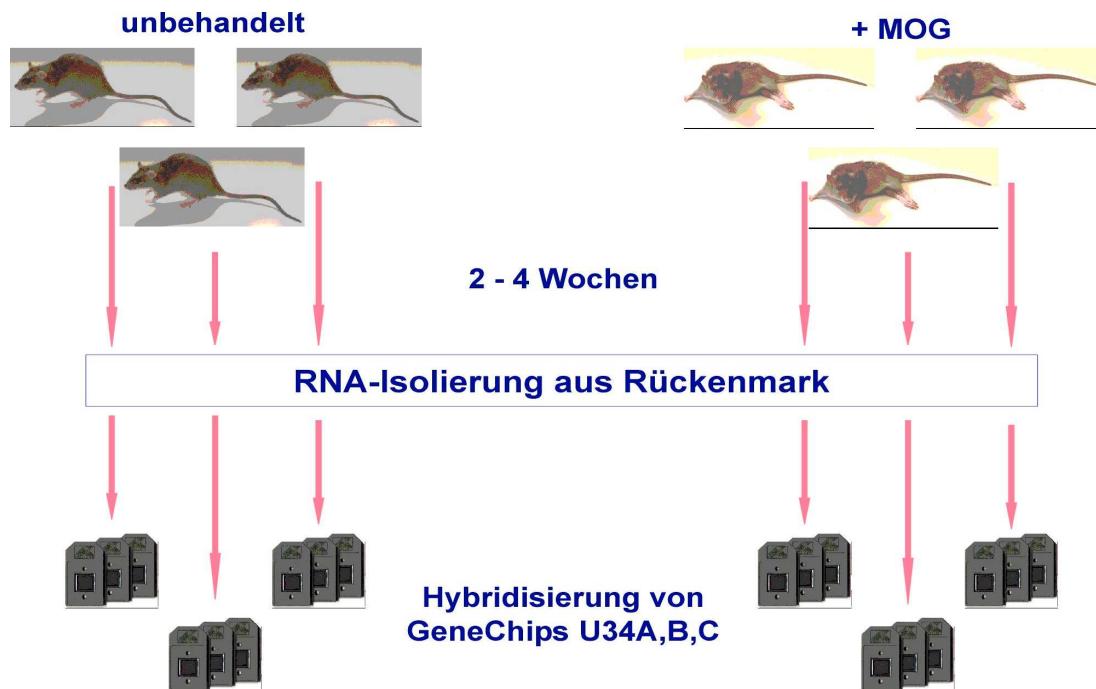


Abbildung 6: Schema der experimentellen Strategie der Expressionsstudien. Eine Gruppe gesunder Ratten sowie jeweils drei Tiere aus der akuten Phase, aus der Remission und der relapsierenden Phase wurde das Rückenmark entfernt. Mit der daraus isolierten RNA wurden die Affymetrix GeneChips U34 A-C hybridisiert.

Vorbereitung der Proben

Die RNA wurde aus den bei -80°C eingefrorenen Geweben in der gleichen Weise isoliert wie für die Durchführung der RealTime-PCR bereits beschrieben. Anschließend wurde die isolierte RNA nach visuellen Anzeichen einer Degradation mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent) untersucht – nur RNA mit hoher Qualität wurde für die Hybridisierung weiterverarbeitet. Die weitere Vorbereitung der Proben und die Akquisition der Daten wurden im Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik (KFB) durchgeführt. Dabei wurde eine biotinylierte cRNA aus der RNA, entsprechend dem von Affymetrix empfohlenen Protokoll, hergestellt (https://www.affymetrix.com/support/technical/other/cdna_protocol_manual.pdf). In Kürze: 10 μg der RNA einer Probe wurde zur Generierung einer doppelsträngigen cDNA mit dem Superscript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit eingesetzt. Daraus wurde mit dem High Yield RNA Transcript Labeling Kit die biotinylierte cRNA in einer *in vitro*-Transkription synthetisiert. Vor der Hybridisierung wurde die markierte cRNA durch metallinduzierte Hydrolyse in Fragment von 35-200bp zerlegt. Die Affymetrix Chips RG U34 A, B und C wurden nacheinander mit jeder Probe in einer rotierenden Kammer hybridisiert (16h, 45°C). Daraufhin wurden die Arrays gewaschen und mit dem G2500A GeneArray Scanner ausgewertet.

Überprüfung der Qualität und Analyse der Daten

Nach der Prozessierung der Hybridisierungsmuster und der absoluten Quantifizierung mit der Affymetrix MAS 5.0 Software wurde die Qualität der Hybridisierung mit Hilfe folgender Parameter bewertet: z.B. das Hintergrundniveau, die Signalverteilung, das Signalrauschen, die durchschnittliche Signalintensität und das Signalverhältnis zwischen Sonden für die 5' und 3' Enden der Haushaltsgene Aktin und der Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) wurden herangezogen. Empirische cut-off Werte wurden für diese Parameter gesetzt, und die Proben, die die definierten Kriterien nicht erfüllten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Damit wurde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse für alle Proben sichergestellt.

Sondensätze, die in weniger als 20% der insgesamt dreizehn Arrays von MAS 5.0 als anwesend bewertet wurden, wurden herausgefiltert und verworfen. Von den 24.000 Genen und ESTs, die auf der Affymetrix-Chip-Serie RG U34 synthetisiert sind, blieben die Daten von 14814 Sondensätzen für die weitere Analyse übrig. Mit diesen Daten wurden drei paarweise Analysen durchgeführt; verglichen wurden gesund gegen akut, gesund gegen Remission und gesund gegen relapsierend. Die Kriterien zur Bewertung einer unterschiedlichen Expression waren: (a) Signalverhältnis größer als 2, was häufig in entsprechenden Publikationen als Grenzwert ausgewählt wurde (Ibrahim et al., 2001; Lock et al., 2002; Nicot et al., 2003; Whitney et al., 2001), und (b) ein univariater Signifikanztest (F-Test) mit den logarithmierten Expressionswerten, bei dem ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ festgelegt wurde. Detailliertere Angaben sind zu finden unter:

http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/statistical_reference_guide.pdf

Eine funktionelle Analyse der Daten mit einer Extraktion überrepräsentierter in einem funktionellen Zusammenhang stehender Gengruppen geschah entweder mit dem von der Firma Affymetrix online zur Verfügung gestellten NetAffx-Software (<https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>) oder mit dem EASE-Programm (Expression Analysis Systematic Explorer, (Hosack et al., 2003)). Für eine weitere Analyse, die auf der Erstellung von sich selbst organisierenden Netzen (*self organizing maps* (SOM)) beruhte, wurde das Clustering-Programm GeneCluster 2.0 verwendet (<http://www.broad.mit.edu/cancer/software/genecluster2/gc2.html>). Eine abschließende Pathway-Analyse wurde mit dem Programm GenMap 2.0 durchgeführt.

Ergebnisse

DNA-Vakzinierung

Bestimmung der Ratten TWEAK und Fn14-Sequenzen

Die Ratten Sequenz von TWEAK war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit noch nicht bekannt. Für die Klonierung der TWEAK-kodierenden Sequenz in den pVax1 wurde der Sense-Primer aus den bekannten murinen und humanen Sequenzen (Chicheportiche et al., 1997) sowie dem BAC-Klon CD230-320N23 (Genbank AC119115) extrapoliert - der Antisense-Primer aus dem Ratten EST348878 (Genbank AW917574). Die kodierende Sequenz von TWEAK, die sich durch eine Sequenzierung dreier unabhängiger Plasmidklone durch die Firma Sequiserve ergab, ist bei Genbank unter AY607588 zu finden.

Die Sequenz des TWEAK-Rezeptors Fn14 ergab sich aus einem Vergleich der Maus-Sequenz (Meighan-Mantha et al., 1999) mit dem Ratten BAC-Klon CD230-202N21 (Genbank AC129053). Die Ratten Fn14-Sequenz wurde unter AY255102 in NCBI veröffentlicht.

Injektion der Vakzinierungskonstrukte

Eine Voraussetzung für das Gelingen der DNA-Vakzinierung war es, sie zielgenau in dem Muskel applizieren zu können. Deswegen wurde in einem Vorversuch eine Ratte narkotisiert und mit dem Farbstoff Evans Blue auf die gleiche Art und Weise intramuskulär gespritzt wie



Abbildung 7: Links: Injektion von EvansBlue in den Tibialis anterior zur Kontrolle der punktgenauen Injektion. Rechts: Ergebnis der Injektion. Der Muskel, in den injiziert werden sollte, wird durch das EvansBlue deutlich moduliert.

anschließend die Versuchstiere. In der Abbildung 7 ist die Injektion von Evans Blue sowie das Ergebnis nach dem Freilegen der Muskel des Unterschenkels zu sehen. Es ist erkennbar, dass es möglich war, den Farbstoff in den *Musculus tibialis* zielgenau zu injizieren.

Expression der Vakzinierungskonstrukte

Die erste Kontrolle für den Erfolg der DNA-Vakzinierung war die Überprüfung der Transkription des injizierten Konstrukts. Dafür wurde eine Woche nach der letzten Vakzinierung ein Tier jeder Gruppe geopfert, und der *Musculus tibialis*, in den die Plasmide injiziert worden waren, sowie der *Musculus gastrocnemius* (Wade) beider Hinterbeine entnommen. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und der Reversen Transkription wurde mit der cDNA eine PCR durchgeführt, für die Primer verwendet wurden, die an den Rändern der Multiple Cloning Site des pVax1-Vektors banden. Dadurch wurde sichergestellt, dass ausschließlich DNA, die von dem injizierten Vektor transkribiert wurde, und nicht die endogene cDNA zu einem positiven Ergebnis führte.

Die Transkriptgröße, die sich aus der Vakzinierung mit FasL-pVax1 ergab, ist 918bp und diejenige aus der Vakzinierung mit TWEAK-pVax1 946bp (Abb. 8). Es ist ersichtlich, dass

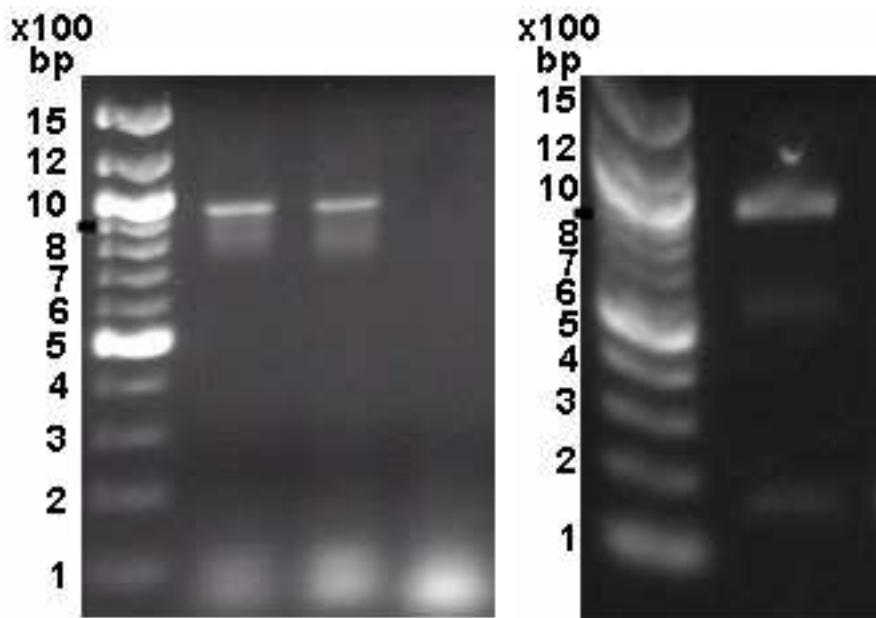


Abbildung 8: LINKS) Ergebnis der RT-PCR mit Proben aus FasL-pVax1-vakzinierter Ratten. Zweimalige Injektion in den *Musculus tibialis* des linken Hinterbeins (Bande 21), einmalige in den des rechten Hinterbeins (Bande 2). In den *Musculus gastrocnemius* wurden kein Konstrukt injiziert (Spalte 3).

RECHTS) RT-PCR mit Proben aus TWEAK-pVax1-vakzinierter Ratten aus dem linken Hinterbein, in das zweimal das Vakzinierungskonstrukt injiziert worden war. Dabei wurde das zweite Vakzinierungsprotokoll ohne Cardiotoxin verfolgt.

Ergebnisse

die Vakzinierung zu einer Transkription des jeweiligen Gens – sogar bei nur einmaliger Vakzinierung – geführt hat, da die PCR-Banden die erwartete Größe zeigten, und dass die Injektion genau den *Musculus tibialis* getroffen hat, da im anliegenden *Musculus gastrocnemius* keine exogene Expression von TWEAK oder FasL nachweisbar war.

Als Kontrolle für die systemische Verteilung der injizierten DNA, wurde mit RNA aus den inguinalen Lymphknoten ebenfalls eine RT-PCR zur Kontrolle der Expression durchgeführt, bei der aber keine Plasmid-DNA nachweisbar war (nicht gezeigt).

Einfluss der DNA-Vakzinierung auf die MOG-induzierte EAE von DA Ratten

Zu Beginn wurde die DNA-Vakzinierung nach dem Protokoll durchgeführt, das zur Unterstützung der Plasmidaufnahme eine Degeneration des Zielmuskels durch Cardiotoxin vorsah. Sechs bis acht Wochen nach der letzten DNA-Vakzinierung wurde bei den Ratten, wie in Material und Methoden beschrieben, EAE induziert. Der klinische und der Gewichtsverlauf wurde danach regelmäßig kontrolliert. Dabei zeigte sich, dass sich der klinische Verlauf der FasL-vakzinierter Gruppe nur wenig von dem der Kontrollgruppe unterschied (Tabelle 4, Abb. 9). Es starben mehr Tiere aus der FasL-Gruppe als aus der

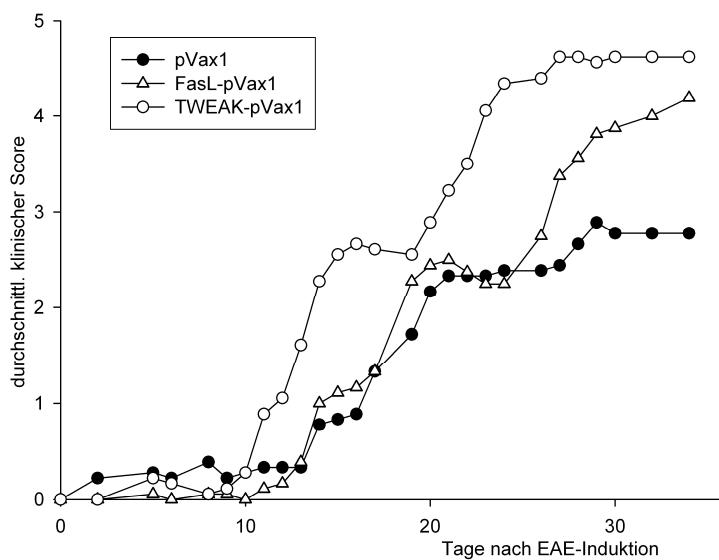


Abbildung 9 :Durchschnittlicher klinischer EAE-Verlauf bei DNA-vakzinierter DA-Ratten

Kontrollgruppe innerhalb der ersten dreißig Tage, und die Erkrankung verlief geringfügig schwerer in der FasL-Gruppe als in der Kontrollgruppe; der kumulative Score war ebenfalls größer als der der Kontrollgruppe. Nur der Krankheitsbeginn war etwas später im Schnitt 2,7 Tage später.

Ergebnisse

Vakzinierung	EAE-Inzidenz	Sterblichkeit (d30)	Max Score (Durchschnitt \pm Standabw.)	Durchschnittl. Beginn der EAE (\pm Standabw)	Durchschnittl. kumulativer Score (\pm Standabw, d30)
pVax1	9/9	3/9	3,9 \pm 2,0	13,1 \pm 4,5	32,9 \pm 16,5
FasL-pVax1	8/9	6/9	4,2 \pm 1,1	15,8 \pm 6,4	38,7 \pm 21,3
TWEAK-pVax1	9/9	7/9	4,6 \pm 0,8	12,1 \pm 4,1	57,8 \pm 15,5

Tabelle 4: Vergleich der klinischen Parameter, die sich aus den verschiedenen DNA-Vakzinierungen ergaben.

Die TWEAK-behandelte Gruppe zeigte allerdings einen deutlich schwereren Krankheitsverlauf als die kontrollvakzinierten Ratten. Sowohl der Krankheitsverlauf, die Letalität als auch der durchschnittliche maximale Score und kumulative Score wiesen auf eine Verstärkung der EAE hin – der Krankheitsbeginn war bei TWEAK vakzinierter Tieren nur unwesentlich früher als bei den Kontrolltieren.

Die Versuche zur Untersuchung des Einflusses der FasL- und TWEAK-Vakzinierungen wurden zur Bestätigung unabhängig voneinander wiederholt. Dabei konnte die Verschlechterung der EAE in der FasL-Gruppe nicht bestätigt werden (Abb.10). Die TWEAK-DNA-Vakzinierung wurde ebenfalls wiederholt. Dabei wurde auf die Cardiotoxinvorbehandlung verzichtet und die Zahl der Injektionen auf zwei reduziert. Die Transkription des exogenen DNA-Konstrukts konnte mithilfe einer RT-PCR wiederum bestätigt werden (Abb.8). Nach der Induktion der EAE ergab sich für die TWEAK-behandelten Tiere erneut eine Verstärkung der EAE-Symptome sowie ein geringfügig früherer Krankheitsbeginn ähnlich wie im ersten Versuch (Tabelle 5). Die Verschlechterung der EAE-Symptome nach der TWEAK-DNA-Vakzinierung zeigte sich noch in zwei weiteren Versuchen (nicht gezeigt).

Aufgrund nicht wegweisender Befunde zum FasL aus dem Vorversuch wurde in der weiteren

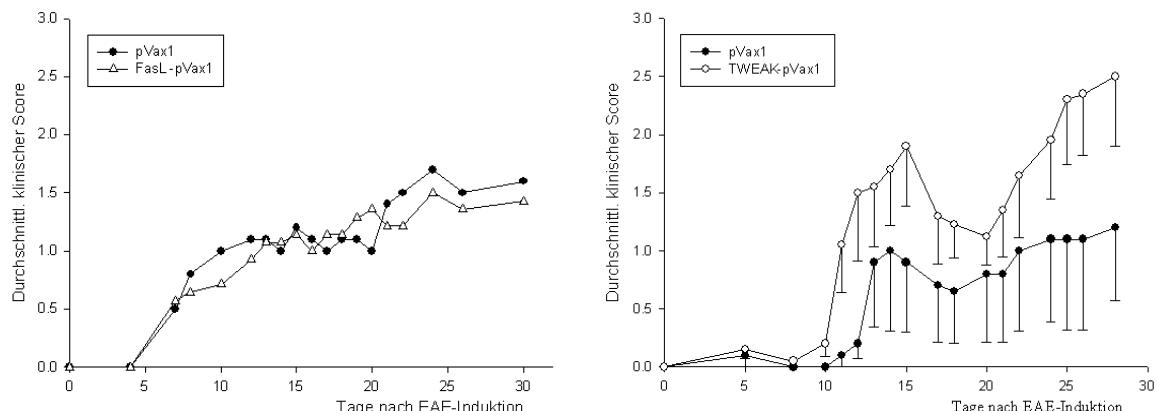


Abbildung 10: Wiederholung der DNA-Vakzinierungen. A) FasL-DNA-Vakzinierung mit Cardiotoxin-Vorbehandlung. B) TWEAK-DNA-Vakzinierung ohne Cardiotoxin

Ergebnisse

Arbeit hauptsächlich der Einfluss von TWEAK auf die Pathogenese der EAE weiterverfolgt.

	EAE-Inzidenz	Sterblichkeit (d28)	Max Score (Durchschnitt \pm Standardabw.)	Durchschnittl. Beginn der EAE (\pm Standardabw)	Durchschnittl. kumulativer Score (\pm Standardabw, d28)
pVax1	5/7	0/7	1,50 \pm 1,5	12 \pm 1	15,4 \pm 22,2
TWEAK-pVax1	8/9	2/9	2,80 \pm 1,7	12,22 \pm 2,1	31,0 \pm 23,6

Tabelle 5: Vergleich der klinischen Parameter der Wiederholung der TWEAK-pVax1-Vakzinierung

Kontrolle der Antikörperantwort nach DNA-Vakzinierung

Ein direkter ELISA wurde durchgeführt, um die Präsenz spezifischer Antikörper in den Sera der vakzinierten Tiere zu bestimmen. Kontrolliert wurden die Titer von FasL- und Tweak-pVax1 vakzinierten Ratten jeweils im Vergleich zu Ratten, die mit dem leeren pVax1-Vektor behandelt worden waren. In der Abbildung 11 ist das Ergebnis eines der ELISA zur Bestimmung des FasL- und TWEAK-Antikörpertiters in Seren aus entsprechend DNA-vakzinierten Ratten zu sehen. Weder die FasL- noch die TWEAK-DNA-Vakzinierung führte zu einer Bildung nachweisbarer Antikörper, da die Reaktionsverläufe mit Seren beider Gruppen sich nicht von den entsprechenden Kontrollseren unterschieden. Deshalb war davon auszugehen, dass die DNA-Vakzinierung nicht in der Lage war, die immunologische Toleranz gegenüber den Autoantigenen TWEAK und FasL zu überwinden. Außerdem wies dies auf einen anderen, nicht über Antikörper vermittelten Mechanismus hin, über den die TWEAK DNA-Vakzinierung den Verlauf der EAE beeinflusste.

TWEAK-Protein ist an der Injektionsstelle nicht detektierbar

Aus dem Muskelgewebe, das eine Woche nach der letzten TWEAK-DNA-Vakzinierung präpariert worden ist, wurden u.a. auch Proteine extrahiert, um festzustellen, ob die Injektion des TWEAK-kodierenden Plasmids nicht nur zur Transkription des TWEAK-Gens, sondern auch zur Translation des TWEAK-Proteins führte. Dafür wurde das Muskelgewebe mechanisch aufgeschlossen, die Proteine extrahiert, durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit TWEAK-Antikörpern (CARL-1 (eBioscience) sowie FL-249 (Santa Cruz Biotechnology)) zur Detektion inkubiert. Auf dem Blot war keine spezifische Bande zu erkennen. Dies könnte bedeuten, dass die TWEAK-cDNA nicht translatiert wurde, dass die produzierte Proteinmenge unterhalb der Sensitivitätsgrenze lag oder dass TWEAK nicht membranständig im Muskel vorlag, sondern

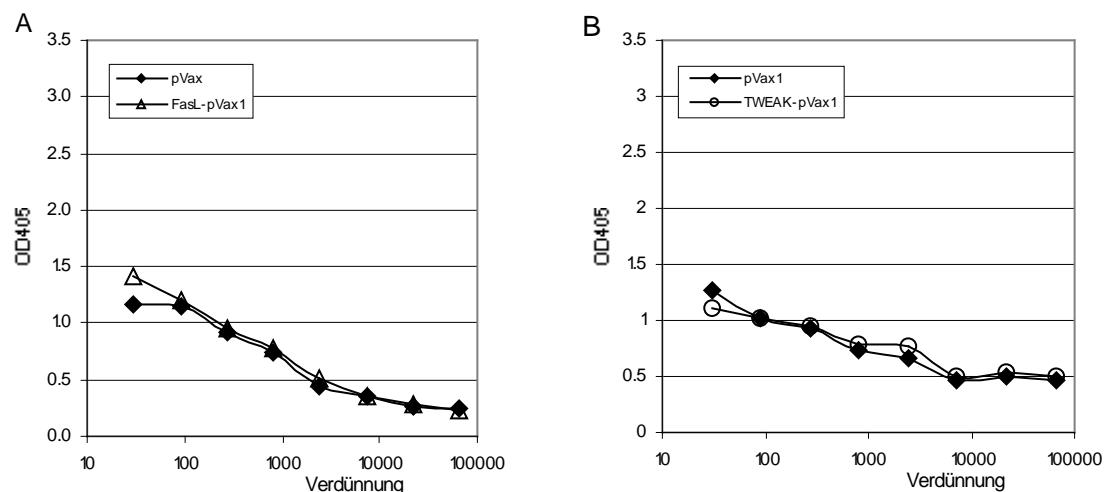


Abbildung 11: ELISA zum Antikörpernachweis. A) Nach FasL-pVax1 Vakzinierung. B) nach TWEAK-pVax1 Vakzinierung

sezerniert wurde. Letzteres entspräche den Befunden vorheriger Publikationen bezüglich TWEAK (Chicheportiche et al., 1997; Desplat-Jego et al., 2002).

Expressionsstudie mit inguinalen Lymphknoten TWEAK-DNA-vakzinierter Ratten

Da die Induktion von Autoantikörpern als Erklärung für den Effekt der TWEAK-pVax1 Vakzinierung ausschied, wurde nach anderen Erklärungsmöglichkeiten gesucht. Da die EAE eine T-Zell-vermittelte Erkrankung des ZNS ist, schien es möglich, dass die TWEAK-DNA-Vakzinierung zu Veränderungen bei der Aktivierung von T-Zellen in Lymphknoten führt. Deshalb wurden sechs Wochen nach der letzten DNA-Immunisierung bei drei TWEAK- und zwei kontrollvakzinierter Ratten die inguinalen Lymphknoten entnommen und zur RNA-Isolierung genutzt, mit der das DNA-Mikroarray-Set Rat Genome U34 (Affymetrix) hybridisiert wurde, welches das gesamte Ratten-Transkriptom repräsentiert. Dabei ergab sich eine Anzahl von 32 signifikant regulierten Genen, von denen 22 in den TWEAK Proben im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert waren und 10 aufreguliert. Von besonderem Interesse war dabei, dass das Gen für den Chemokin-Rezeptor CXCR4 in drei unabhängigen Sondensätzen aufreguliert gefunden wurde.

Name	Probeset	Regulation
Lactalbumin, alpha	X00461_at	0.19
EGL nine homolog 3 (C. elegans)	U06713_at	0.34
Casein kappa	K02598_at J00710_at	0.37 0.40
Casein beta	J00711_at	0.43
Rat ig delta heavy chain constant region and 3' utr	J00741_at	0.47
Similar to zinc transporter 5 (LOC294698)	rc_AI146110_at	0.49
Medium-chain S-acyl fatty acid synthetase thio ester hydrolase	Y00311_at	0.51

Ergebnisse

(MCH)		
Phosphatidylinositol transfer protein (Pitpn)	rc_AI070726_at	0.51
Immunoglobulin rearranged kappa-chain mRNA variable (V) region	L07409_at	0.52
Collagen, type III, alpha 1	M21354_s_at	0.60
Tumor protein p53 inducible protein 11	rc_AI102028_at	0.61
EST218070	rc_AI172075_at	0.61
Ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 8 (Asb8)	rc_AI070624_at	0.61
Similar to hypothetical protein CL25084	rc_AI009492_at	0.61
Weakly similar S36109:osteoblast-specific factor 2(mouse)	rc_AA894092_at	0.62
Similar to RIKEN cDNA 1110005A23 (LOC362819)	rc_AI007847_s_at	0.62
EST211803	rc_AI102514_at	0.64
--	rc_AA818035_at	0.64
Osteoglycin (Ogn)	rc_AI171281_at	0.64
--	rc_AI072269_at	0.65
--	rc_AA819103_at	0.65
--	rc_AA926316_at	0.66
EST223630	rc_AI179899_f_at	0.66
Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	rc_AA818858_s_at	1.64
Similar to hypothetical protein dJ465N24.2.1 (LOC362626)	rc_AI045196_at	1.68
Chemokine receptor CXCR4	U90610_g_at U90610_at rc_AA945737_at	1.70 2.04 1.65
EST228976	rc_AI232288_at	1.71
Dynactin 4	rc_AI235707_g_at	1.82
Transcribed sequences	rc_AI014135_g_at	1.82
Cytochrome b5	rc_AA945054_s_at	1.95
CDK103	rc_AI014135_at rc_AI014135_g_at	2.03 1.82
Genes for 18S, 5.8S, and 28S ribosomal RNAs	rc_AI176460_s_at	2.15
Synaptic vesicle glycoprotein 2 b (Sv2b)	rc_AA942964_g_at	2.20
cDNA encoding chytochrome P-450	E00717UTR#1_s_at	3.94

Tabelle 6: Zusammenstellung der in inguinalen Lymphknoten regulierten Gene der TWEAK-DNA vakzinierten Ratten im Vergleich zu kontrollvakzinierten Tieren

Die Expression des Chemokin Rezeptor CXCR4 im Lymphknoten wurde mit anderen Tieren aus dem gleichen Experiment mithilfe der RealTime-PCR kontrolliert. Dabei ergab sich eine ungefähr zweifache Aufregulierung des CXCR4-Gens (Abb. 12A).

TWEAK-DNA-Vakzinierung verstört die ZNS-Infiltration von T-Zellen zu Beginn der Krankheit

Um die T-Zellinfiltration ins ZNS, mit der die EAE initiiert wird, zu quantifizieren, wurden die Rückenmärker von vier mit TWEAK-pVax1 und vier mit pVax1 vakzinierten Tieren am Tag 10 nach EAE-Induktion isoliert, homogenisiert und mittels WesternBlot hinsichtlich ihres Gehalts an dem T-Zell-spezifischen CD3, bezogen auf das Haushaltsprotein Aktin, untersucht. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Tiere noch kaum klinische Symptome.

Das Ergebnis dieser Untersuchung war, dass Ratten, die mit TWEAK-pVax1 behandelt

worden waren, ca. dreimal so viel CD3 im Rückenmark hatten wie die pVax1 vakzinierten (Abbildung 12B.). Daraus lässt sich schließen, dass die TWEAK-DNA Injektion die Infiltration von T-Zellen in das Rückenmark fördert.

TWEAK-DNA-Vakzinierung hat keinen Einfluss auf die Proliferation von autoreaktiven T-Zellen

Aufgrund der Unterschiede der CD3-Proteinmenge *in situ* wurde der Einfluss der TWEAK-DNA Injektion auf die Induktion myelinspezifischer, primärer T-Zellantworten untersucht. Am Tag 10 nach der EAE-Induktion wurden den Ratten neben dem Rückenmark auch die Lymphknoten entnommen, um deren Zellen (LNCs) in Kultur zu bringen und deren Proliferation nach Stimulation mit dem zur Immunisierung verwendeten enzephalitogenen Antigen MOG zu untersuchen. Die Zellen wurden dazu vier Tage kultiviert, wobei für die letzten 24h mit Tritium markiertes Thymidin hinzugegeben wurde. Bei der anschließenden

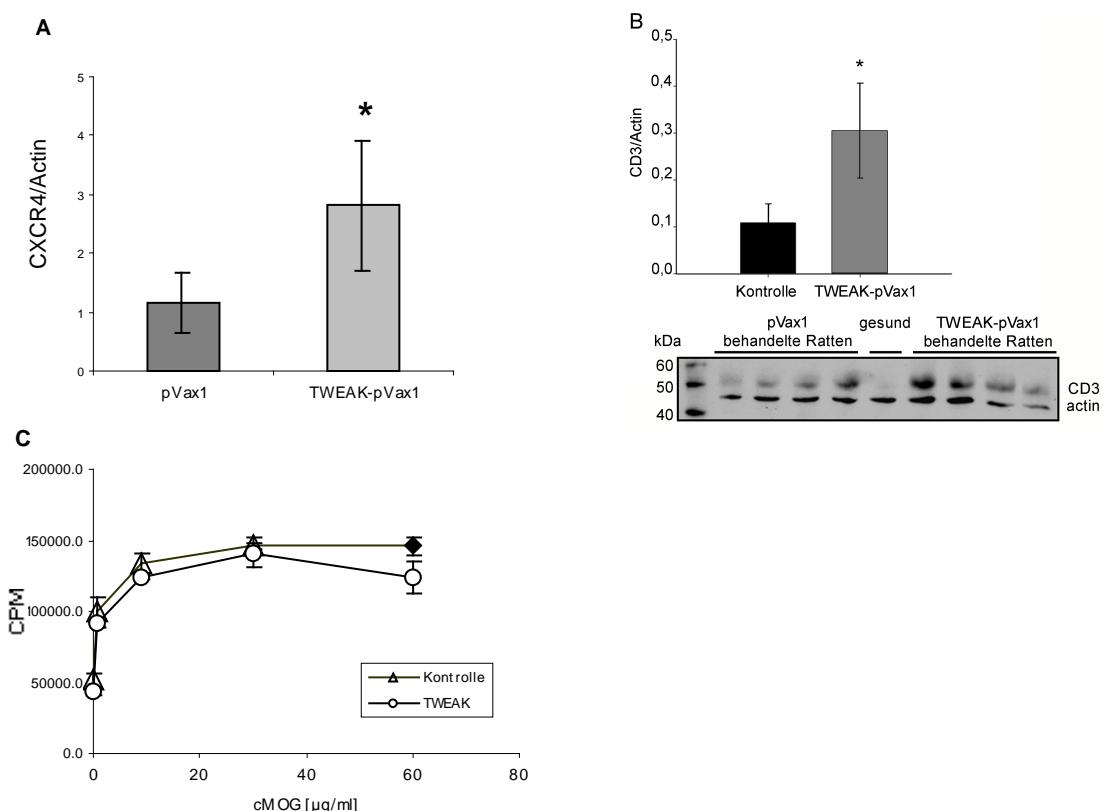


Abbildung 12: **A)** Expression von CXCR4 in Lymphknoten von fünf TWEAK-DNA-vakzinierten Ratten sowie 3 Kontrolltieren, bestimmt durch RealTime-PCR. Die Balken repräsentieren die durchschnittliche Expressionsmengen, normalisiert auf die β Aktin Expression \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$. **B)** CD3-Protein im Rückenmark von DNA-vakzinierten Ratten. Balken repräsentieren den Durchschnitt von vier Tieren pro Gruppe \pm Standardabweichung, normalisiert auf β Aktin (oben). Darstellung des zugrundeliegenden WesternBlots (unten). **C)** Proliferationsassay mit LNC von TWEAK-DNA- und Kontroll-DNA-vakzinierten Ratten. Darstellung des durchschnittlichen Einbaus von radioaktivem Thymidin \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$.

Messung der inkorporierten Radioaktivität ergab sich kein Unterschied zwischen den TWEAK- und den kontrollvakzinierten Tieren (Abbildung 12C). Daraus ergibt sich, dass die TWEAK-DNA-Vakzinierung nicht die Induktion von primären T-Zellantworten verstärkt.

TWEAK induziert CCL2-Produktion bei Astrozyten und verstärkt sie in zerebralen Endothelzellen

Die exogene Produktion von TWEAK-Protein im injizierten Muskel und dessen Freisetzung in die Zirkulation könnte eine Erklärung für die Verschlechterung der Krankheit sein. Zirkulierendes, lösliches TWEAK könnte z.B. die Chemokin-Produktion in Endothelzellen induzieren – es ist bekannt, dass TWEAK in kultivierten HUVEC die Produktion von CCL2 (früher: monocyte chemoattractant Protein-1) induziert (Harada et al., 2002). Dies könnte zur Migration von Immunzellen ins ZNS führen und so zur Verstärkung der EAE beitragen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden zerebrale Endothelzellen (Zelllinie RBE4 (von Françoise Roux, Paris)) und Astrozyten (Zelllinie CTX TNA2) mit jeweils 500ng/ml TWEAK inkubiert und nach 24h bzw. 48h die CCL2-Konzentration im Überstand bestimmt. Endothelzellen und die Endfüße von Astrozyten sind die zwei wesentlichen Bestandteile der Bluthirnschranke.

Bei diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die zerebralen Endothelzellen konstitutiv CCL2 produzieren und sich die Produktion durch TWEAK um bis zu 50% steigern ließ.

Die Astrozyten produzierten im Gegensatz zu den RBE4-Zellen konstitutiv nur sehr geringe Mengen CCL2. Nach einer TWEAK-Stimulation allerdings wurde die CCL2-Sekretion offensichtlich stark induziert (Abb. 13).

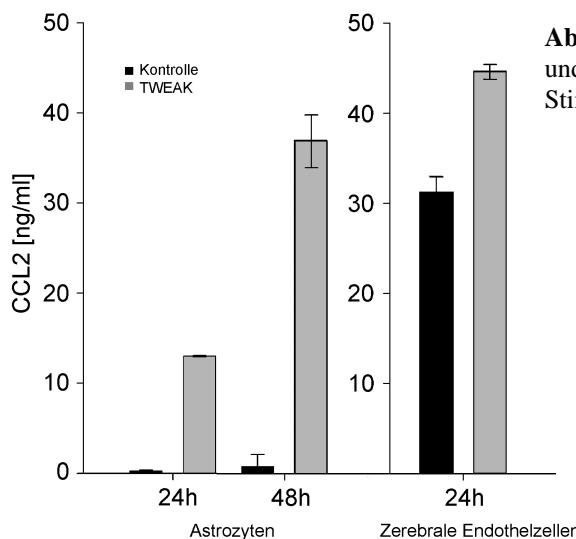


Abbildung 13: CCL2 Produktion durch Astrozyten (links) und zerebrale Endothelzellen (rechts) nach TWEAK-Stimulation (\pm Standardabweichung)

TWEAK-DNA-Vakzinierung führt nicht zur erhöhten CCL2-Konzentration im Serum

CCL2 wurde auch in den Sera von TWEAK- und kontrollinjizierten Ratten sechs Wochen nach der zweiten Vakzinierung per ELISA gemessen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 14). Dass die CCL2-Menge im Blut durch die Vakzinierung nicht deutlich verändert worden ist, bedeutet allerdings nicht zwangsläufig, dass die CCL2 Menge nicht doch lokal am ZNS-Endothel erhöht sein könnte.

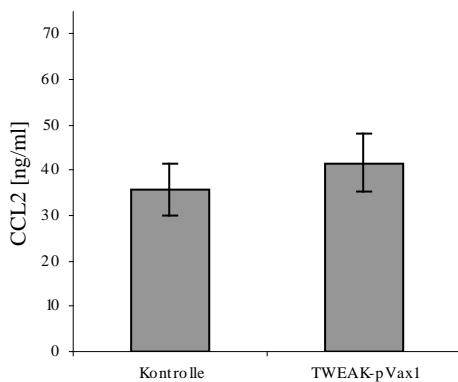


Abb.14: CCL2 im Serum von DNA-vakzinierten Tieren

Produktion von TWEAK-Protein nach Transfektion von Astrozyten

Da im *Musculus tibialis*, in dem das eukaryotische Expressionsplasmid injiziert worden war, kein TWEAK-Protein nachgewiesen werden konnte, wurde eine andere Methode zum TWEAK-Protein Nachweis ausgewählt. Da es aus unterschiedlichen Gründen nicht gelungen war, TWEAK mittels Antikörper direkt zu bestimmen, wurde versucht, die Translation des TWEAK-DNA-Konstrukts zu belegen, indem Astrozyten mit TWEAK-pVax1 transfiziert wurden und deren CCL2-Sekretion daraufhin mittels ELISA gemessen wurde. Als Kontrolle

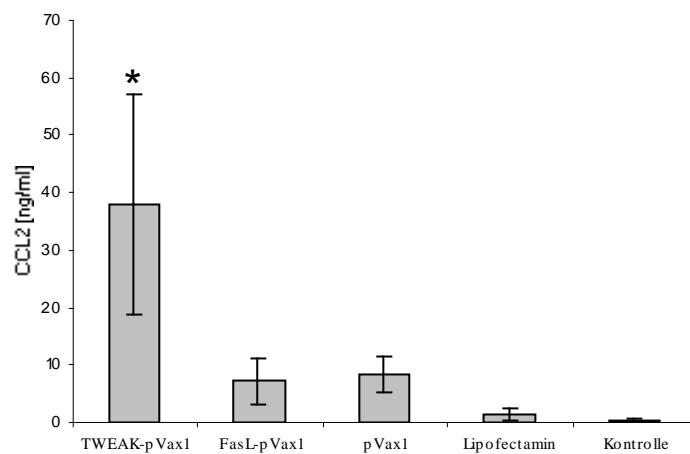


Abbildung 15: CCL2 Konzentration im Überstand von Astrozyten-Zellkulturen, die mit TWEAK-pVax1 transfiziert bzw. kontrollvakziniert waren (\pm Standardabweichung)

Ergebnisse

dienten entsprechende Ansätze mit FasL-pVax1, pVax1, Lipofectamin ohne DNA sowie gänzlich unbehandelte Astrozyten. Das Ergebnis dieses Versuchs war eine starke Induktion der CCL2-Produktion bei den Astrozyten, die mit TWEAK-pVax1 transfiziert worden waren (Abbildung 15). Die CCL-2 Produktion in diesem Ansatz war dabei signifikant höher als in den Kontrollansätzen.

Proteinvakzinierung zur Antikörperinduktion

Die TWEAK-DNA-Vakzinierung hatte eine Verstärkung der EAE-Symptome zur Folge. Allerdings führte sie nicht zu dem eigentlich gewünschten Ergebnis, nämlich der Induktion von Antikörpern zur Blockierung der TNFSF-Moleküle. Deswegen wurden die Tiere in der Folgezeit mit rekombinanten Proteinen und dem Adjuvant Aluminiumhydroxid (Alum) immunisiert, von dem bekannt ist, dass es starke Antikörperantworten stimuliert (Brewer et al., 1999; Wallberg et al., 2003).

Das Molekül Fn14 (fibroblast growth factor-inducible-14, TNFSF12A) wurde kürzlich als maßgeblicher Rezeptor für TWEAK identifiziert (Nakayama et al., 2003). Deswegen wurde eine analoge Vakzinierung mit dem Rezeptorprotein durchgeführt.

Vakzinierungen mit rTWEAKext/Alum und rFn14/Alum erzeugen starke Antikörperantworten

Vakziniert wurde i.p. mit einer Suspension aus 30 μ l Aluminiumhydroxid und 70 μ l einer Lösung von 50 μ g der extrazellulären Domäne des rekombinanten TWEAK (rTWEAKext,

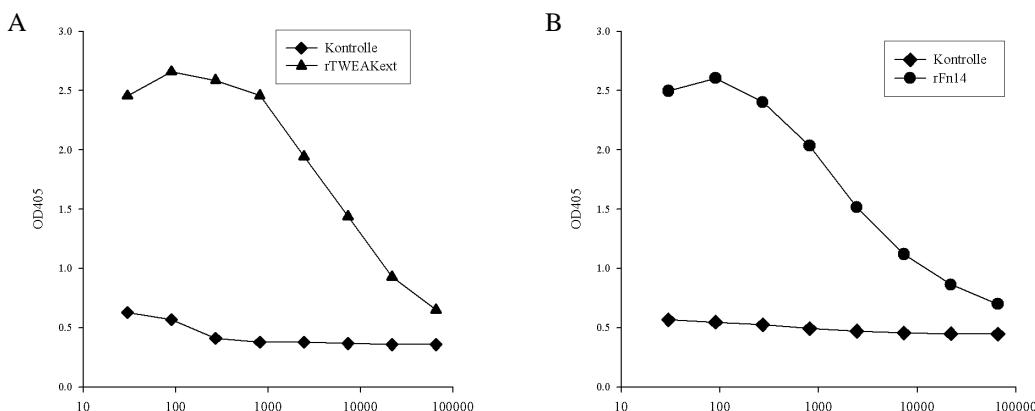


Abbildung 16: Induktion von Autoantikörpern in DA-Ratten durch Protein-Vakzinierung. **A)** rTWEAKext, **B)** rFn14.

Ergebnisse

Aminosäuren 95-249) in PBS. Ähnlich wie bei der DNA-Injektion wurde der Ansatz zweimal gespritzt mit einer dreiwöchigen Pause. Zwei bis drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde den Ratten zur Bestimmung des Antikörpertiters an einer Schwanzvene Blut entnommen. Mittels eines direkten ELISA konnte ein hoher Antikörpertiter gegen TWEAK nachgewiesen werden (Abbildung 16A)

Ein analoges Ergebnis ergab sich bei der Vakzinierung mit dem Fn14-Protein (rFn14). Bei den rFn14 vakzinierter Tieren konnte ein deutlicher, reproduzierbarer Antikörpertiter gemessen werden (Abbildung 16B).

Antikörper mit Spezifität für rTWEAKext bzw. rFn14 können TWEAK-Effekte neutralisieren

Um die biologische Aktivität der induzierten Antikörper zu testen, wurde ihr Einfluss auf die TWEAK-induzierte Produktion durch Endothelzellen *in vitro* untersucht (Harada et al., 2002). Dafür wurde aus den Immunseren von rTWEAKext- und rFn14-vakzinierter Ratten das Gesamt-IgG mit Protein G gekoppelten Sepharose-Säulen aufgereinigt und die entsprechende Fraktion des Säuleneluats mittels eines direkten ELISA mit dem jeweiligen Antigen identifiziert.

Die Funktionalität dieser Antikörper wurde anschließend mit HUVEC-Zellen (human umbilical vein endothelial cells) getestet, von denen bekannt ist, dass TWEAK bei ihnen die Sekretion des Chemokins CCL2 induziert (Harada et al., 2002). Funktionelle Antikörper gegen TWEAK bzw. Fn14 sollten also in diesem Assay in der Lage sein, TWEAK bzw. seinen Rezeptor zu binden und damit die CCL2-Freisetzung zu inhibieren.

In dem Versuchsansatz wurden die HUVECs für 24h in EGM-2A Medium mit TWEAK sowie den IgG-Fraktionen kultiviert, die aus den rTWEAKext-, rFn14- oder

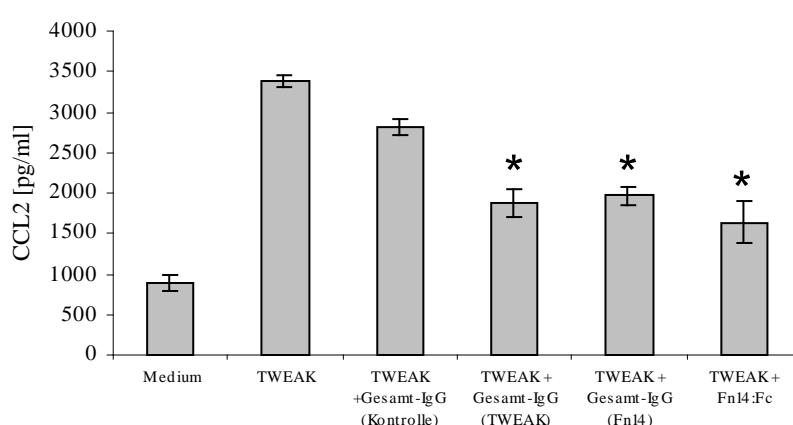


Abbildung 17: Inhibierung der CCL2-Produktion von HUVEC-Zellen nach TWEAK-Stimulation durch Antikörper aus rTWEAKext- und rFn14-vakzinierter Ratten. $p \leq 0,05$

kontrollvakzinierten Ratten isoliert worden waren. Als zusätzliche Kontrolle wurden die HUVEC-Zellen mit TWEAK sowie einem Fn14-Fc-Fusionsprotein inkubiert, welches mit dem membrangebundenen Fn14 um das lösliche TWEAK konkurriert. Antikörper aus rTWEAKext- sowie rFn14-vakzinierten Tieren reduzierten die CCL2-Sekretion um ca. 40%, wohingegen die Antikörper aus den kontrollbehandelten Tieren keinen entsprechenden Effekt zeigten. Eine ähnliche Verminderung der CCL2-Produktion war auch nach einer Inkubation mit dem Fn14:Fc-Fragment zu sehen (Abbildung 17).

Die *in vivo* Blockade von TWEAK und Fn14 verbessert den klinischen Verlauf in zwei EAE-Modellen

Die Blockade von TWEAK und Fn14 *in vivo* wurde zuerst im Modell der MOG-induzierten EAE der DA-Ratte untersucht. Dabei wurden die Tiere zweimal mit drei Wochen Abstand mit rTWEAKext bzw. rFn14 in Aluminiumhydroxid oder mit dem Adjuvant alleine vakziniert; sechs bis acht Wochen nach der letzten Vakzinierung folgte dann die EAE-Induktion.

Die mit rFn14 vakzinierten Ratten entwickelten einen signifikant milderen Krankheitsverlauf als die Kontrolltiere. Während der Krankheitsbeginn in allen Gruppen vergleichbar war, waren der durchschnittliche, maximale sowie der kumulative Score und die Letalität der EAE in den Fn14- behandelten Tieren signifikant reduziert (Tabelle 7). Durch die Vakzinierung mit rTWEAKext wurde der Krankheitsverlauf ebenfalls verbessert, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei rFn14. Der klinische Verlauf der rTWEAKext behandelten Ratten verschlechterte sich kontinuierlich während der chronischen Phase der Krankheit, während

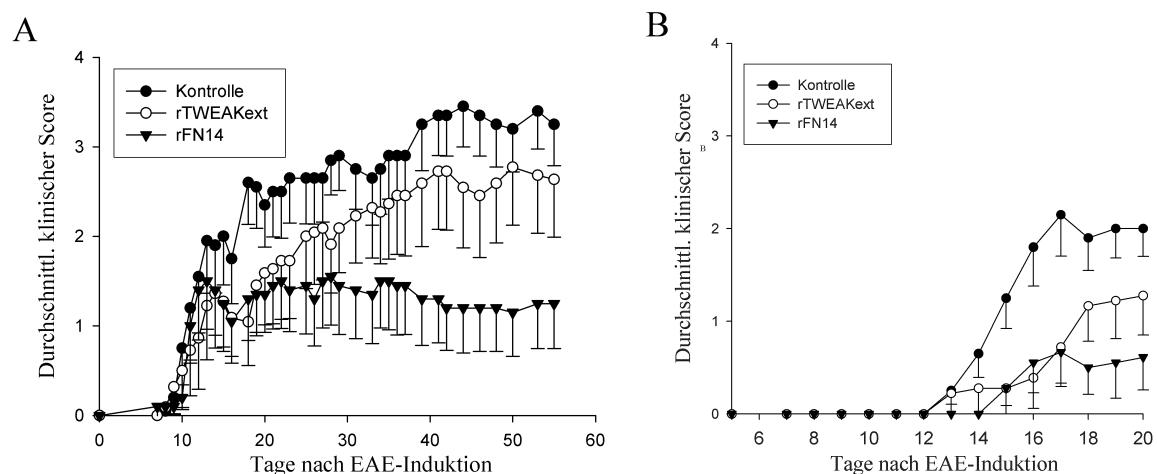


Abbildung 18: Klinischer Verlauf der EAE nach rTWEAKext- bzw. rFn14-Proteinvakzinierungen, - Standardfehler. **A)** MOG-induzierte EAE bei DA-Ratten. **B)** PLP-Peptid-induzierte EAE bei SJL/J-Mäusen

Ergebnisse

der Effekt der rFn14-Vakzinierung während der Beobachtungsperiode von zwei Monaten bestehen blieb (Abbildung 18A). Die rTWEAKext- und rFn14-vakzinierten Ratten hatten zudem an Tag 11 nach der Induktion der EAE einen niedrigen MOG-Antikörpertiter als die Kontrollratten (Abb. 19).

Spezies	Vakzinierung	EAE-Inzidenz	Sterblichkeit (d30)	max. Score \pm Stabw	Beginn der EAE \pm Stabw	kumulativer Score (Tag)
DA Ratten	Kontrolle	10/10	4/10	3.95 \pm 1.1	13.7 \pm 4.6	133 (d57)
	rTWEAKext	9/10	4/10	3.45 \pm 1.8	17.55 \pm 10.3	111 (d57)
	rFn14	8/10	1/10	2.3 \pm 1.7	16.13 \pm 8.0	63 (d57)
SJL Mäuse	Kontrolle	9/10	0/10	2.6 \pm 1.2	14.56 \pm 1.7	12 (d20)
	rTWEAKext	5/9	0/9	1.5 \pm 1.4	16.2 \pm 1.9	6 (d20)
	rFn14	3/9	0/9	0.8 \pm 1.2	15.33 \pm 0.6	3 (d20)

Tabelle 7: Vergleich der klinischen Parameter der verschiedenen Protein-Vakzinierungen.

In einem ähnlichen Ansatz wurde die Rolle von TWEAK bzw. Fn14 in der PLP-Peptid-induzierten EAE von SJL/J-Mäusen untersucht. Zur Vakzinierung wurden die gleichen rekombinanten rTWEAKext- und rFn14-Proteine verwendet, was aufgrund der Homologie der Proteinsequenzen zwischen Ratten und Maus möglich erschien (bei TWEAK = 97,6% und im Fall von Fn14 = 93,1%). Ähnlich wie bei der Signalübertragung von FasL, bei dem die Homologie ausreichte, so dass das Protein vom Menschen, die Apoptose in Mäusezellen auslösen konnte und umgekehrt (Nagata, 1997), könnte dies für Ratten-TWEAK in Mäusezellen möglich sein.

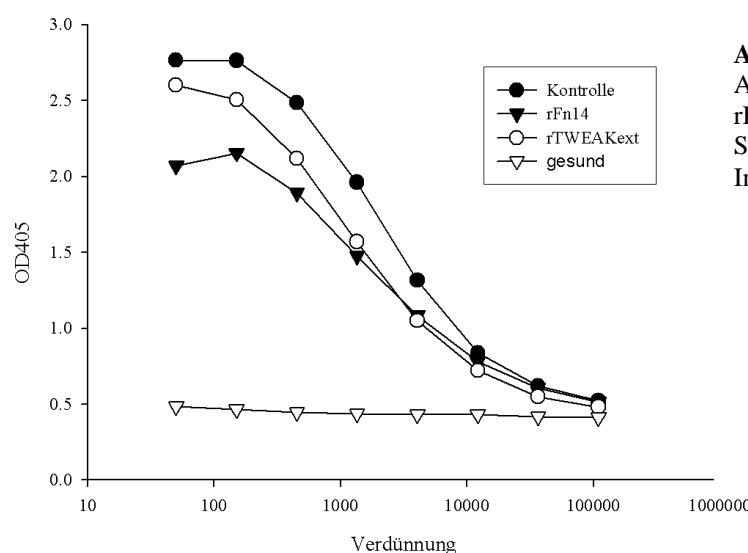


Abbildung 19: Reduzierung des MOG-Antikörpertiter bei rTWEAKext- und rFn14-vakzinierten DA-Ratten. Die Seren wurden an Tag 11 nach EAE-Induktion gewonnen.

Auch bei den SJL/J-Mäusen erzeugte die Protein-Vakzinierung hohe Antikörper-Titer gegen das jeweilige Protein (Abb. 20). Die Verbesserung des klinischen Verlaufs bestätigte sich ebenfalls (Abb. 18B). An Tag 20 hatten neun von zehn Kontrollmäusen klinische Symptome einer EAE entwickelt, aber nur fünf von neun der rTWEAKext- und drei von neun der rFn14-

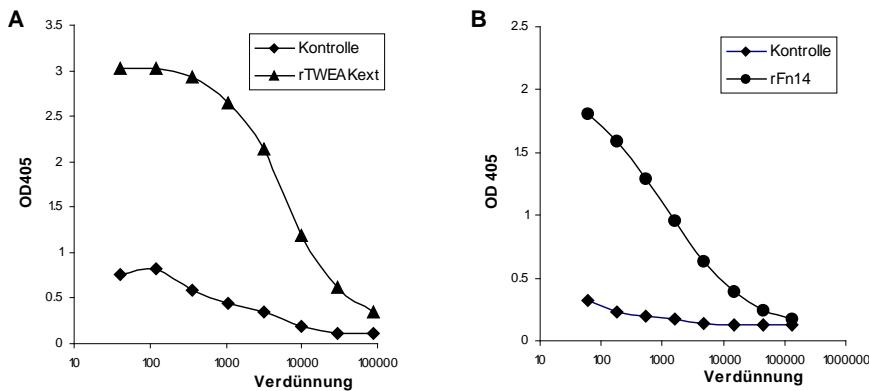


Abbildung 20: Induktion von Autoantikörpern in SJL/J-Mäusen durch Protein-Vakzinierung. A) rTWEAKext, B) rFn14.

behandelten Tiere (Tabelle 8). Auch hier bewirkte die rTWEAKext-Vakzinierung eine Verringerung der Krankheitssymptome, die aber ebenso wie bei den DA-Ratten weniger stark ausgeprägt war als der Effekt der Fn14-Vakzinierung.

Diese Daten belegen, dass eine Vakzinierung gegen Fn14 – und in etwas geringerem Maße auch gegen TWEAK – die Entwicklung einer Autoimmunkrankheit des ZNS in zwei verschiedenen Spezies, unabhängig von der Wahl des enzephalitogenen Antigens, verhindert.

Die rTWEAKext- und rFn14-Vakzinierungen vermindern die Ausprägung von entzündlichen ZNS-Läsionen

Der krankheitsverbessernde Effekt der rFn14- und rTWEAKext-Vakzinierungen legte nahe, dass auch die Bildung der mit der EAE assoziierten inflammatorischen EAE-Läsionen verringert sein sollte. Um dies zu untersuchen, wurden die Mäuse aus dem Proteinvakzinierungsexperiment am Tag 20 nach der EAE-Induktion perfundiert und die Rückenmärker für eine histopathologische Analyse präpariert. Eine HE-Färbung wurde durchgeführt, um die größtenteils aus Makrophagen und Lymphozyten bestehenden entzündlichen Läsionen in den verschiedenen Behandlungsgruppen zu quantifizieren. Zur Analyse wurde eine semiautomatische Imageanalyse-Software verwendet – dabei wurde die Fläche der entzündlichen Läsionen sowie die Gesamtfläche der RM-Querschnitte bestimmt und miteinander ins Verhältnis gesetzt. Die Mäuse, die mit rFn14 oder mit rTWEAKext vakziniert worden waren, hatten signifikant weniger Infiltrate als die Kontrolltiere (Abb. 21).

Ergebnisse

Das Ausmaß der Entzündungen im Rückenmark spiegelt als den klinischen Score am Tag der Perfusion wider.

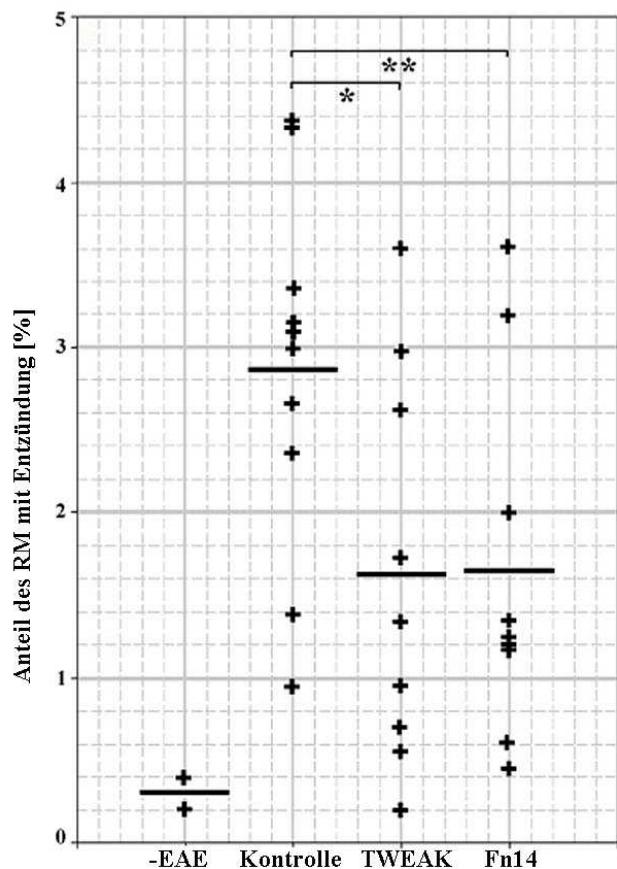


Abbildung 21: Entzündliche ZNS-Läsionen in SJL/J-Mäusen werden durch rTWEAKext- und rFn14-Vakzinierung verringert. Jeder Punkt repräsentiert den prozentualen Anteil der entzündlich veränderten Rückenmark-Fläche bezogen auf die Gesamtfläche einer Maus – die horizontale Linie entspricht dem Gruppendurchschnitt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren signifikant (einseitiger ANOVA: *: $p= 0,031$ ** $p= 0,027$).

Die TWEAK-Proteinvakzinierung verringert nicht die Enzephalitogenität der autoreaktiven T-Zellen

Die Fn14-vermittelten Effekte auf die Läsionspathogenese könnten auf der Ebene der Induktion und Aktivierung myelinreaktiver, enzephalitogener T-Zellen wirksam sein. Neben den bereits genannten Experimenten wurden deshalb erste Untersuchungen im Modell der durch den adoptiven Transfer von aktiven, enzephalitogenen T-Zellen ausgelösten EAE unternommen.

Die adoptive Transfer EAE hat neben dem sehr synchronen Krankheitsverlauf den Vorteil, dass eine Zellpopulation isoliert wird und dann bei den Empfängertieren die EAE induziert. Durch die Induktion eines TWEAK-Antikörpertiters in den Donortieren konnte also untersucht werden, ob der protektive Einfluss der TWEAK-Proteinvakzinierung durch eine Veränderung in der Population der enzephalitogenen T-Zellen bewirkt wird. Wenn die LNCs, die von Tieren isoliert wurden, die Antikörper gegen TWEAK entwickelt haben, eine gleich

Ergebnisse

starke EAE induzieren können, wie LNCs von kontrollvakzinierten Mäusen, ist davon auszugehen, dass der protektive Effekt der TWEAK-Proteinvakzinierung nicht durch Veränderungen der T-Zellen vermittelt wird.

Zunächst wurden Donortiere mit rTWEAKext zweimal vakziniert. Vier Wochen nach der zweiten Vakzinierung wurden die Antikörpertiter gegen TWEAK in den Mäusen bestimmt. Die TWEAK-vakzinierten Tiere zeigten im Gegensatz zu den Kontrollmäusen einen hohen Antikörpertiter (Abb. 21A). Anschließend wurden die Tiere mit dem PLP-Peptid immunisiert. Der Transfer von 10^7 der *in vitro* mit dem PLP-Peptid restimulierten LNCs dieser Tiere induzierte eine EAE, deren Schweregrad unabhängig davon war, ob die Donortiere mit TWEAK vakziniert waren oder nicht (Abb. 21B) - weder der klinische Verlauf, die Inzidenz, der Zeitpunkt des Beginns der EAE-Symptome, der durchschnittliche maximale Score noch der durchschnittliche maximale kumulative Score unterschieden sich signifikant.

	EAE-Inzidenz	Sterblichkeit (d28)	Max Score (\pm Standardabw.)	Beginn der EAE (\pm Standardabw.)	kumulativer Score (\pm Standardabw., d22)
Kontrolle	10/10	1/10	$3,8 \pm 0,54$	$9,6 \pm 1,65$	$39,45 \pm 9,62$
rTWEAKext	10/11	0/11	$3,54 \pm 1,31$	$10,9 \pm 3,01$	$36,4 \pm 13,37$

Tabelle 8: Vergleich der klinischen Parameter der AT-EAE von SJL/J-Mäusen nach rTWEAKext- und Kontrollvakzinierung der Donortiere.

Aus diesem ersten Experiment lässt sich folgern, dass die Proteinvakzinierung wahrscheinlich keinen Effekt auf die T-Zellenzephalitogenität hat. Dieses Ergebnis muss allerdings durch analoge Experimente ergänzt werden, in denen die Donortiere mit rFn14 vakziniert werden.

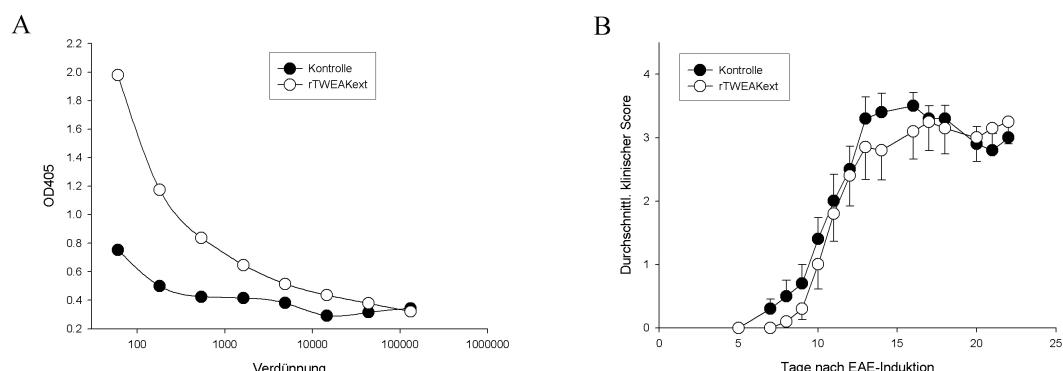


Abbildung 21: AT-EAE-Verlauf von SJL-Mäusen, bei der die Donortiere proteinvakziniert wurden. **A)** Bestimmung des TWEAK-Antikörpertiters in den Donortieren vier Wochen nach der zweiten Vakzinierung. **B)** Durchschnittliche EAE-Verläufe der erkrankten Tiere nach Transfer der enzephalitogenen LNCs von proteinvakzinierten Mäusen auf vorher unbehandelte Mäuse.

Ergebnisse

EAE-Expressionsstudie

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten mittels einer mRNA-basierten Expressionsstudie die transkriptionellen Veränderungen untersucht werden, die im ZNS im Krankheitsverlauf der MOG-induzierten EAE der DA-Ratte auftreten. Diese Studie hatte zum Ziel, die molekularen Zusammenhänge etwas besser zu verstehen sowie neue Therapieansätze zu identifizieren.

EAE-Verlauf der ausgewählten Ratten

Für die Analyse der Expressionsveränderungen im Verlauf der EAE im Rückenmark von DA-Ratten wurden letztendlich dreizehn Tiere ausgewählt. Jeweils drei Tiere waren gesund,

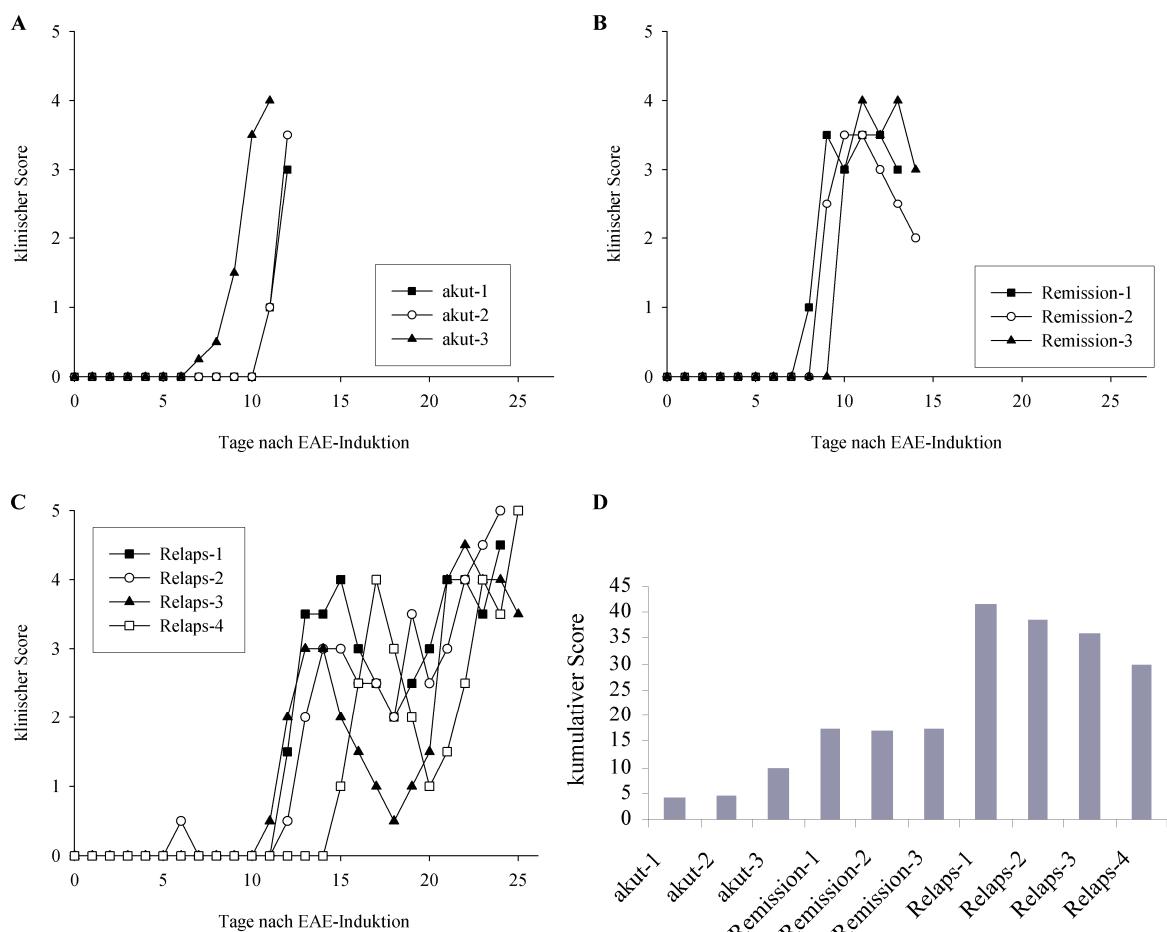


Abbildung 22: Übersicht über Krankheitsverläufe der für die Expressionsstudien ausgewählten DA-Ratten. **A)** Tiere aus der akuten Phase. **B)** Tiere aus der Remission. **C)** Tiere aus der relapsierenden Phase. **D)** Kumulativer Score aller untersuchten Tiere.

Ergebnisse

befanden sich in der ersten, akuten Phase der EAE (Tag 11 und 12 nach Induktion der EAE) und aus der Remission (Tag 13, 14 nach Induktion). Vier Tiere befanden sich am Tag der Perfusion in der chronischen, relapsierenden Phase der EAE (Tag 24 bzw. 25 nach EAE-Induktion). Eine Übersicht über die jeweiligen Krankheitsverläufe befindet sich in Abbildung 22.

Übersicht

Jeweils drei Rückenmärker von gesunden DA-Ratten und von kranken Tieren aus der akuten Phase und aus der Remission sowie von vier Ratten aus der relapsierenden Phase der EAE wurden für die Isolierung der Gesamt-RNA und zur Hybridisierung der Affymetrix RG U34-Mikrochips verwendet, wie in Material und Methoden beschrieben. Das Rat Genome U34 Set (RG U34) erlaubte es, Expressionsdaten von mehr als 24.000 Sondensätzen zu erhalten. Ein Sondensatz entspricht dabei einer Sequenz, die ein Teil eines bereits bekannten Gens oder eines ESTs sein kann (Expressed Sequence Tags: kurze cDNA-Fragmente (~200–500bp) von mRNA, die einmalig im menschlichen Genom vorkommen und deren Sequenz und relative Lokalisation im Genom bekannt sind). Ein Sondensatz besteht dabei in der Regel aus 16 Oligonukleotiden, die jeweils einem bestimmten Gen entsprechen. Mehrere Sondensätze können dabei einem einzigen Gen entsprechen, wie z.B. bei den Sätzen *L21995_s_at* und *M99485_at*, die beide dem Gen für das *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein* entsprechen (Abbildung 23).

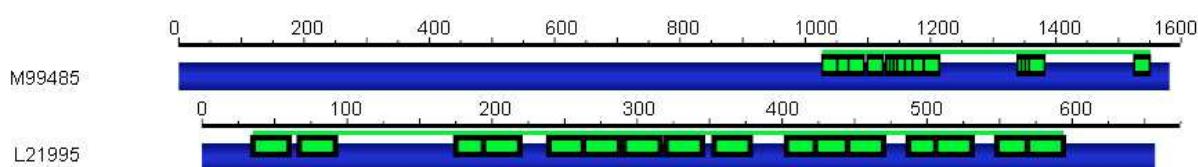


Abbildung 23: Darstellung der kodierenden Sequenz von MOG. **Oben:** Position der Sonden (grün) des Sondensatzes M99485 auf der MOG-Gesamtsequenz. **Unten:** Position der Sonden des Sondensatzes L21995 auf dem 5'-Ende der MOG-Sequenz.

Aufgrund der unterschiedlich starken Affinitäten der synthetisierten Sonden zu der eingesetzten cRNA sowie des Vorkommens unterschiedlicher Splice-Formen und Polymorphismen, die das Hybridisieren mit einzelnen Sonden modifizieren, können die Expressionsdaten unterschiedlicher Sondensätze für das gleiche Gen leicht variieren.

Eine Größe, um festzustellen, wie erfolgreich die Hybridisierung eines Arrays war, ist der so genannte Scale-Faktor. Bei ihm handelt es sich um einen Faktor, mit dem bei der Normalisierung der Rohdaten alle Werte einer Hybridisierung multipliziert werden, um alle

Ergebnisse

Arrays auf die durchschnittliche Signalintensität von 100 zu standardisieren. Wenn sich die Scale-Faktoren verschiedener Hybridisierungen zu stark voneinander unterscheiden, schränkt dies die Vergleichbarkeit dieser Daten ein. Als akzeptabel gelten Scale-Faktoren, die sich um weniger als den Faktor drei unterscheiden, denn durch das unterschiedliche *Up-* bzw. *Downscalen* könnten die Ergebnisse verzerrt werden. Eine Übersicht über die Scale-Faktoren, die für die Normalisierung dieser Studie nötig waren, ist in Tabelle 10 zu sehen. Die Scale-Faktoren der Hybridisierungen mit RNA von gesunden Tieren oder Ratten aus der Remission und der relapsierenden Phase sind verhältnismäßig homogen. Allerdings wichen die Scale-Faktoren der ersten Ratte aus der akuten Phase so stark von den anderen beiden ab, dass ein weiteres Tier aus der akuten Phase dieser Studie hinzugefügt wurde. Dessen Scale-Faktoren waren etwas besser mit denen der anderen Tiere vergleichbar, so dass die Expressionsdaten dieses Tieres verwendet wurden.

Array	gesund			akut-1				Remiss			relaps.-			
	1	2	3	akut-2	akut-3	akut-4	ion-1	ion-2	ion-3	1	2	3	4	
RG U34A	0,767	0,625	0,344	1,57	0,751	0,55	1,059	0,872	0,767	0,541	0,779	0,344	0,297	0,552
RG U34B	0,905	0,873	1,038	5,766	1,115	1,147	5,296	1,027	1,507	1,03	0,894	0,38	0,432	1,074
RG U34C	0,606	0,388	0,687	4,864	0,84	0,446	4,418	0,814	0,907	0,7	1,585	0,647	0,623	0,859

Tabelle 9: Auflistung der Scale-Faktoren, gruppiert nach Versuchsgruppe sowie Array-Typ.

Zu Beginn der Datenanalyse wurden alle Sondensätze herausfiltriert, die von der MAS-Software nicht in mindestens 20% der Hybridisierungen als *anwesend* eingeschätzt worden sind. Von den 24000 Sondensätzen blieben nach dieser Filterung 14814 übrig. Das heißt, dass diese 14814 Transkripte in mindestens einer der überprüften Situationen im ZNS exprimiert worden sind. Ein großer Teil dieser Gene ist reguliert. Eine Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene befindet sich Tabelle 11. Dort ist die Zahl der Sondensätze zusammengefasst, die in paarweisen Vergleichen zwischen den Gruppen erkrankter und gesunder Tiere mindestens zweifach reguliert waren, mindestens bei 20% der hybridisierten Arrays als anwesend bewertet wurden und für die die Nullhypothese eines gleichen Expressionsniveaus mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ verworfen werden konnte. Für die spätere funktionelle Analyse wurden allerdings auch Gene mit berücksichtigt, die als anwesend bewertet wurden, jedoch nicht signifikant reguliert waren. Das Miteinbeziehen dieser Daten für die Auswertung funktioneller Zusammenhänge erleichtert die Einschätzung der Relevanz regulierter Gene im Kontext zusammenhängender Genfamilien.

Ergebnisse

	akut – gesund	Remission – gesund	relapsierend – gesund
aufreguliert			
≥2fach	437	322	138
≥4fach	34	35	3
≥8fach	10	8	1
herunterreguliert			
≥2fach	349	404	105
≥4fach	91	65	25
≥8fach	54	17	7

Tabelle 11: Anzahl der Sondensätze, die zu verschiedenen Zeitpunkten der EAE im Vergleich zu gesunden Tieren im ZNS reguliert sind. Bedingungen: Sondensatz ist mindestens in 20% der hybridisierten Arrays als *anwesend* bewertet worden und Wahrscheinlichkeit für die Nullhypothese ist kleiner oder gleich 5%.

Die Ratten aus der relapsierenden Phase der EAE (Tag 24 bzw. 25) zeigten eine geringere Zahl regulierter Gene im Vergleich zu den gesunden Tieren als die anderen beiden Gruppen. Eine Prinzipielle Komponenten Analyse (PCA), bei dem die unterschiedlichen RNA-Proben anhand Ähnlichkeiten ihrer Expressionsprofile zueinander angeordnet werden, ergab, dass die Expressionsmuster der Tiere aus der relapsierenden Phase im Vergleich zu den anderen Phasen relativ heterogen waren. So *clusterte* ein Array von einem Tier aus der relapsierenden Phase zusammen mit denen aus der Remission, und ein anderes Tier zeigte ein Expressionsmuster, das denen der gesunden Tiere relativ ähnlich schien (Abbildung 24). Dies könnte eine Erklärung für die geringere Anzahl an regulierten Genen sein, die in der relapsierenden Phasen gefunden wurden.

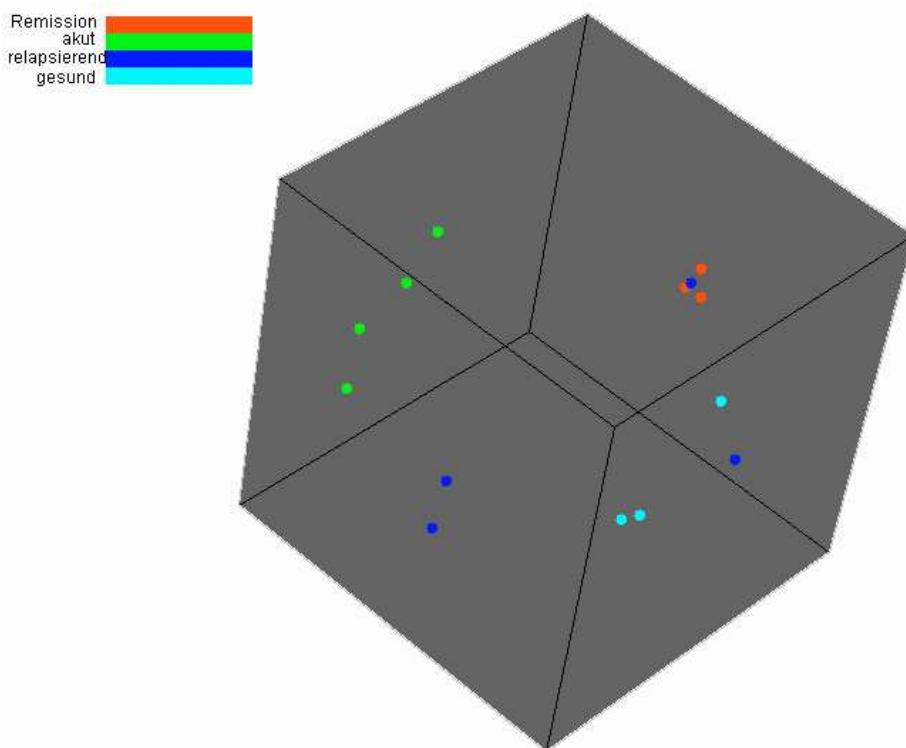


Abbildung 24: Screenshot eines dreidimensionalen Clusterings der Ergebnisse aus der Hybridisierung der A-Chips, (erstellt mit BRB ArrayTools 3.02). Die Transkriptome wurden innerhalb eines dreidimensionalen Raums aufgrund ihrer Ähnlichkeit angeordnet – je weiter sie voneinander entfernt sind, umso mehr unterscheiden sich ihre Expressionsmuster voneinander.

Ergebnisse

Da die entzündlichen Läsionen im ZNS durch die Infiltration von im Blut zirkulierenden Leukozyten verursacht werden, kann eine Veränderung der Genexpression im ZNS während der EAE durch zwei unterschiedliche Vorgänge ausgelöst werden: 1. durch Gene, die in den infiltrierenden Zellen exprimiert sind, 2. durch die Regulation der Genexpression bei ZNS residenten Zellen oder das Sterben ZNS residenter Zellen während der Krankheit, was generell zu einer Verminderung der Expression der Gene dieser Zellen führt.

Da die Immunzellen Gene zumindest zum Teil exprimieren, die von neuronalen Zellen nicht exprimiert werden, und umgekehrt, lassen sich anhand der Expressionsdaten Hypothesen über die Zelltypen generieren, die für die jeweiligen Veränderungen verantwortlich sind.

Es kann dabei ausgeschlossen werden, dass die gefundenen Veränderungen der Expression auf sekundäre Prozesse, wie eine generell erhöhte durchschnittliche Expression bei Hybridisierungen mit RNA aus EAE-Tieren zurückzuführen ist, denn die Expressionswerte jedes Gens wurden gegen den Medianwert aller Hybridisierungen vor der Analyse normalisiert.

Expressionsprofile der nicht in inflammatorischen Zellen exprimierten Gene

Um regulierte Gene zu identifizieren, die spezifisch in ZNS-residenten Zellen und nicht in infiltrierenden Zellen exprimiert wurden, wurden alle Gene, die in Lymphknoten exprimiert waren, von den im ZNS exprimierten Genen herausgefiltert. Die Liste, der im Lymphknoten exprimierten Gene, stammt aus dem Experiment, in dem Lymphknoten-RNA aus pVax1-behandelten Ratten zur Hybridisierung der Arrays benutzt wurde. Das heißt, dass alle Gene aus dieser Analyse entfernt wurden, die in den Lymphknoten dieser Tiergruppe als anwesend eingeschätzt worden sind, um zumindest den Großteil der regulierten Gene, die von infiltrierenden Zellen stammen könnten, auszuschließen und näherungsweise die ZNS-spezifischen Gene zu erhalten. Eine Übersicht über die Anzahl dieser *ZNS-spezifischen*, regulierten Transkripte befindet sich in Tabelle 12.

	akut – gesund	Remission – gesund	relapsierend – gesund
aufreguliert			
≥2fach	4	17	2
≥4fach	2	3	1
≥8fach	0	0	0
herunterreguliert			
>2fach	185	43	37
≥4fach	20	3	1
≥8fach	1	0	0

Tabelle 12: Anzahl der regulierten Transkripte von ZNS-residenten Zellen.

Ergebnisse

Besonders auffallend dabei ist, die niedrige Zahl aufregulierter Transkripte und der erhöhte Anteil an herunterregulierten Genen bei den *ZNS-spezifischen* Transkripten. Mehr als die Hälfte aller in der akuten Phase herunterregulierten Gene sind *ZNS-spezifisch*, während bei den aufregulierten Transkripten nur ein sehr kleiner Bruchteil (~1,5%) nicht auch in den Lymphknoten exprimiert wird.

Die Gene, die am stärksten reguliert und zusätzlich nicht in den Lymphknoten exprimiert waren, sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

ZNS-spezifische Gene	Sondensatz	akut – gesund	Remission – gesund	relapsierend – gesund
S100 calcium-binding Protein A9 (calgranulin B)	L18948_at	4,04*	0,53	0,52*
Lysyl oxidase	S66184_s_at	5,07*	1,26	1,37
Phospholipase D1	AB000778_s_at	3,99**	1,72	2,04
Aldehyde dehydrogenase family 9, subfamily A1	rc_AI639218_at	2,2	4,13*	1,62
Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4A	rc_AA963340_at	0,57	4,68*	1,24
Solute carrier family 1, member 3	rc_AA899125_at	1,61	4,88**	2,24
Angiotensin receptor-like 1	rc_AA945996_at	5,7*	2,45	4,11*
Gap junction Protein, beta 6 (connexin 30)	rc_AI059426_at	0,12*	0,66	0,83
Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 11	rc_AA943700_at	0,13**	0,88	0,68
Oligodendrocyte myelin glycoprotein (Omg)	rc_AA964584_at	0,16**	0,77	0,74
Transcribed sequences	rc_AA901317_at	0,16*	1	1,1
EST227125 (tubulin, beta 4)	rc_AI230430_at	0,18**	0,43*	0,44*
Neurotensin receptor 2	X97121_at	0,18	0,75	0,94
Neurofilament, light polypeptide	M25638_s_at	0,18**	0,30**	0,45
Synaptotagmin b	U63740_at	0,22**	0,78	0,63
Myelin-associated oligodendrocytic basic Protein (MOBP)	D28810_g_at	0,25*	0,18*	0,55
RAB3A, member RAS oncogene family	X06889cds_at	0,21*	0,21*	0,44*
Clathrin, light polypeptide (Lcb)	rc_AI172090_s_at	0,71	0,22*	0,49
Acetylcholinesterase T subunit	S50879_at	0,26*	0,25*	0,35*
Complexin 1	D70817_at	0,28	0,25*	0,40**
N-ethylmaleimide sensitive factor	AF091834_at	0,26*	0,08*	0,25*

Tabelle 13: Die am stärksten regulierten Transkripte von ZNS-residenten Zellen, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Eine Analyse der Expression der ZNS-spezifischen Transkripte mittels Self Organizing Maps (SOM) und dem Programm *Gene Cluster 2.0*, bei der Gene anhand ihrer Expressionsprofile gruppiert werden, bestätigte, dass die Expression dieser Gene fast ausschließlich verringert

wird. Aus Abbildung 25, die das Ergebnis einer Gruppierung in 9 *Gen-Cluster* zeigt, wird ersichtlich, dass es nach der Herunterregulation in der akuten Phase generell zu einer Erhöhung der Expression dieser Gene kommt (besonders stark in den *Clustern* 1,2 und 5). Darunter befinden sich Gene wie z.B. der *GABA Transporter*, *Synaptogyrin 1* oder *Amphiphysin*. Von diesem Trend weichen nur die Gene im *Cluster* 6 ab. Sie zeigen keine vermehrte Transkription während der Remission. Gene aus diesem Cluster wären *Lifeguard*, *Visinin-like 1* oder *Plasmolipin*. In der relapsierenden Phase der EAE kommt es in der Regel zu einer Trendumkehr – das heißt, dass die Transkripte, deren Expression in der Remission angestiegen ist, wieder schwächer exprimiert werden. Abweichend davon kam es bei den Genen im Cluster 3 in der relapsierenden Phase zu keiner Veränderung der Expression im Vergleich zur Remission und bei denen der *Cluster* 6 und 7 zu einem leichten Anstieg.

Abnahme Oligodendrozyten-spezifischer Transkripte

Die MOG-induzierte EAE in DA-Ratten zeichnet sich unter anderem durch eine starke Demyelinisierung im ZNS aus (Storch et al., 1998). Dies spiegelt sich in den vorliegenden Expressionsdaten wider. In allen Phasen der EAE ist eine Abnahme der Expression Oligodendrozyten-spezifischer Gene zu sehen (Abb. 25). Oligodendrozyten sind die Myelinbildenden Gliazellen – eine Verminderung von Transkripten, die spezifisch für Oligodendrozyten sind, ist ein Beleg dafür, dass vermehrt Oligodendrozyten im Verlaufe der EAE zugrunde gehen oder funktionell beeinträchtigt sind, was durch mehrere EAE-Modelle bestätigt wird (Dowling et al., 1997; Hisahara et al., 2003; Pender et al., 1991). Die Herunterregulation dieser Gene ist allerdings nur in der akuten Phase der Krankheit relativ stark. Je länger die Krankheit fortbesteht, um so mehr nähert sich die Genexpression dem

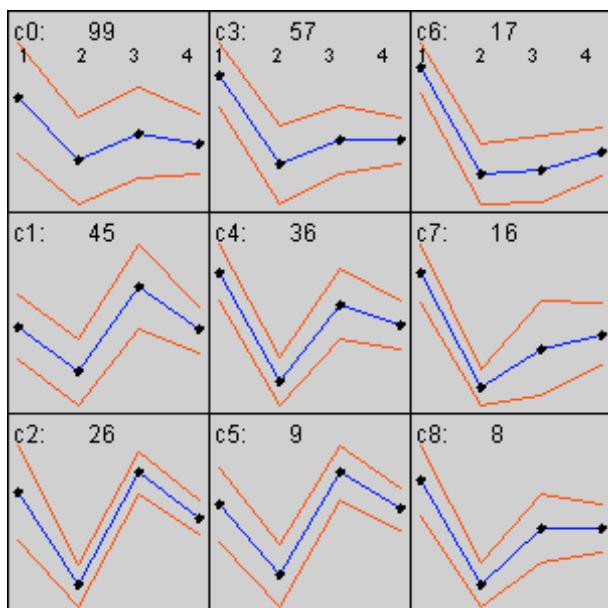


Abbildung 25: Ergebnis einer SOM-Analyse der Gene der ZNS-residenten Zellen mit *Genecluster 2.0* – ausgehend von einer 3x3-Matrix. Links oben in jedem Quadrat befindet sich die Nummer des Cluster. Oben in der Mitte ist die Anzahl der Gene in dem jeweiligen Cluster zu finden. Die blauen Linien kennzeichnen die durchschnittlichen Expressionsprofile jedes Clusters, die roten die extremen. 1 entspricht dem Durchschnitt der gesunden Tiere, 2 der Tiere aus der akuten Phase, 3 der aus der Remission und 4 derjeniger Tiere aus der relapsierenden Phase der EAE.

Ergebnisse

Normalwert wieder an. Obwohl die Oligodendrozyten das Ziel des Immunangriffs (besonders in der MOG-induzierten EAE) sind, kommt es nicht zu einer nachhaltigen oder persistierenden Einschränkung der Expression von oligodendroglialen Genen. Die Liste der regulierten Oligodendrozyten-spezifischen Gene befindet sich in Tabelle 14.

Oligodendrozytengene	Sondensatz	akut – gesund	Remission – gesund	relapsierend – gesund
Myelin oligodendrocytic glycoprotein (MOG) ⁽¹⁾	L21995_s_at	0,25	0,23	0,54
	M99485_at	0,21	0,78	0,74
Myelin basic Protein (MBP) ⁽¹⁾	K00512_at	0,50*	0,44*	0,74
	rc_AI145512_at	0,76	0,8	0,91
Myelin-associated oligodendrocytic basic Protein (MOBP) ⁽¹⁾	D28810_at	0,31	0,93	1,12
	D28810_g_at	0,25*	0,18*	0,55
	D28111_at	0,32*	0,52	0,60
	D28111_g_at	0,43*	0,77	0,75
Myelin-associated glycoprotein (MAG)	M22357_at	0,36	0,35	0,66
	M22357_g_at	0,50*	0,65	0,93
	X06554_s_at	0,39*	0,38	0,8
Proteolipid Protein (PLP)	M25888_at	0,62	1,07	0,98
	rc_AI070277_s_at	0,47*	0,80	0,87
	rc_AI072770_s_at	0,40*	0,75	0,82
Oligodendrocyte myelin glycoprotein (Omg) ⁽¹⁾	rc_AA964584_at	0,16**	0,77	0,74
2'-3'-cyclic nucleotide Phosphodiesterase 1 (CNP)	L16532_at	0,48*	0,64	0,85

Tabelle 14: Übersicht über die regulierten Oligodendrozyten-spezifischen Gene. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis zwischen den verschiedenen EAE-Phasen und gesunden, naiven Ratten, *: $p \leq 0,05$, ⁽¹⁾ ausschließlich im ZNS exprimiert.

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde zuerst eine RealTime-PCR mit RNA aus den entsprechenden Proben durchgeführt (Abb. 26). Dabei ist die durchschnittliche MOG-mRNA-Menge in den verschiedenen EAE-Phasen, standardisiert auf die Transkripte des Haushaltsgens β Aktin in der gleichen Probe, im Verhältnis zu den gesunden Tieren dargestellt. Dabei war, entsprechend der Ergebnisse aus den Mikroarrays, in der akuten Phase

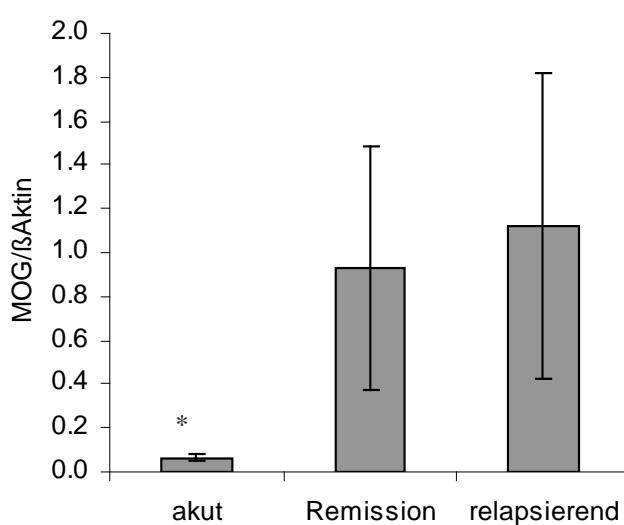


Abbildung 26: Ergebnis der MOG-RealTime-PCR mit RNA aus dem Rückenmark von Tieren, die sich entweder in akuten Phase, in der Remission oder in der relapsierenden Phase der EAE befanden. Die Ergebnisse stehen im Verhältnis zur MOG-Expression bei gesunden Tieren. *: $p \leq 0,05$. Pro Gruppe wurden drei Tiere untersucht.

Ergebnisse

der EAE eine sehr starke, signifikante Abnahme der MOG-Transkripte zu erkennen. Während der Remission und der relapsierenden Phase der EAE kommt es, ausgehend von der RealTime-PCR, zu einer Erholung der MOG-Expression. Die hohe Standardabweichung, besonders bei den Tieren aus der relapsierenden Phase, ist eine Konsequenz der bereits erwähnten Heterogenität der Proben aus der relapsierenden Phase der EAE.

Um diese Analyse durch Proteindaten zu ergänzen, wurde ein WesternBlot zur Detektion von MOG-Protein im ZNS-Gewebe durchgeführt. In einer volumetrischen Auswertung ergab sich eine konstante Abnahme des MOG-Proteins über den untersuchten Verlauf der EAE hinweg. In der Remission ist die Konzentration des MOG-Proteins unverändert im Vergleich zur akuten Phase, aber in der relapsierenden Phase sank die Konzentration weiter, und in einem Tier war es kaum zu detektieren. In der Abb.27 ist der Scan des WesternBlot sowie dessen Auswertung zu sehen. Der Blot konnte aufgrund des großen Unterschieds im Molekulargewicht gleichzeitig mit einem anti-Aktin-Antikörper (Chemicon) und einem monoklonalen-anti-MOG-Antikörper, der aus dem Überstand eines Hybridoms isoliert worden war, inkubiert werden.

Die WesternBlot-Ergebnisse deuten in die gleiche Richtung wie RNA-Expressionsstudien. Allerdings weisen die stark verringerten Mengen an MOG-Protein in der relapsierenden Phase der EAE darauf hin, dass die erhöhte MOG-mRNA Synthese in dieser Phase nicht zu einer Akkumulation des MOG-Proteins führt.

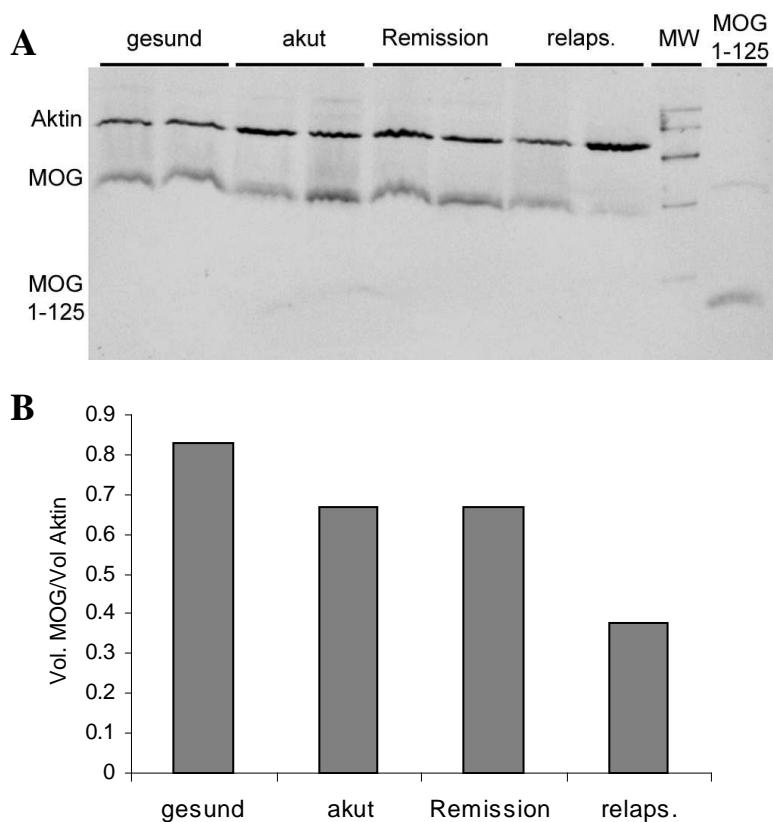


Abbildung 27: Ergebnis eines WesternBlots zur MOG-Detektion im ZNS von DA-Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten der EAE. **Oben:** WesternBlot mit je zwei gesunden Tieren, aus der akuten Phase der EAE, der Remission und der relapsierenden Phase der EAE. **Unten:** Volumetrische Auswertung der MOG-Banden, bezogen auf die Banden des Kontrollproteins Aktin.

Erniedrigung der Gene der Cholesterin Biosynthese

Cholesterin ist ein essenzieller Bestandteil von eukaryotischen Plasmamembranen und Myelin – es macht 20-30% des Fettanteils des ZNS aus, hat eine wichtige Funktion bei der Regulation der Fluidität von Membranen, scheint essenziell für die effiziente Synthese von Synapsen zu sein (Mauch et al., 2001) und beeinflusst die Funktion von Ionenkanälen und Transmitterrezeptoren. Die Tabelle 15 und die Abbildung 28 zeigen, dass mehrere Gene und vor allem die HMG-CoA Reduktase als zentraler Regulator der Cholesterinbiosynthese während der Remission und der relapsierenden Phase supprimiert sind.

Transkripte aus Cholesterin Biosynthese	Sondensatz	akut – gesund	Remission – gesund	relapsierend – gesund
Cytochrome P450, subfamily 7B, poly-peptide 1	U36992_at	1,84	2,27**	1,53
HMG-CoA lyase	rc_AI171090_at rc_AI171090_g_at rc_AA945052_at	1,29* 2,28* 1,85	0,86 1,58 1,82	1,14 1,44 1,84*
HMG-CoA synthase 2 (mito)	M33648_at M33648_g_at rc_AI102731_at rc_AI232320_s_at	1,07 1,76 1,02 0,78	1,22 2,95 1,11 0,47	1,25 2,26 1,04 0,63
Mevalonate kinase	M29472_at rc_AA924198_s_at	1,14 0,56*	1,34 0,56*	1,02 0,63*
Cholesterol delta Isomerase	rc_H33491	0,97	0,69	0,78
2,3-oxidosqualene (Lanosterol oxidase)	D45252_s_at U31352_at	0,88 0,84	0,68 0,51	0,74 0,71
Diaphorase 1	J03867_s_at	0,85	0,57*	0,75
Mevalonate pyrophosphate decarboxylase	U53706_at	0,82	0,51*	0,74
Geranyl-trans transferase	rc_AI236566_at rc_AI180442_at	0,78* 0,63	0,83 0,45	0,71** 0,46
Squalene synthase ⁽¹⁾	M95591_at M95591_g_at rc_AA859392_s_at rc_AI229016_s_at	0,43* 0,39* 0,36* 0,71*	0,13* 0,36 0,09** 0,42*	0,30* 0,36* 0,18** 0,48**
Squalene epoxidase	D37920_at rc_AA819300_at	0,45* 0,64	0,43* 0,54	0,37* 0,65
Isopentyl-diphosphate delta isomerase	AF003835_at	0,63*	0,68	0,49
HMG-CoA reduktase	M29249cds_at rc_AA924210_at X55286_at X55286_g_at	0,48 0,59 0,43 0,49	0,10* 0,29* 0,46 0,18*	0,26 0,36** 0,39* 0,27*
7-dehydrocholesterol reduktase	AB016800_at AB016800_g_at	0,47 0,42	0,44 0,68	0,57 0,63
HMG-CoA synthase 2, cyto	rc_AI177004_s_at X52625_at	0,24* 0,41*	0,11* 0,53	0,12* 0,35*
Isopentyl-PP-isomerase	rc_AI236611_at	0,41*	0,45	0,35**
Lathosterol oxidase	rc_AI043855_at	0,38*	0,27*	0,36*
Cytochrome P450, subfamily 51	AB004096_at	0,36*	0,35	0,30

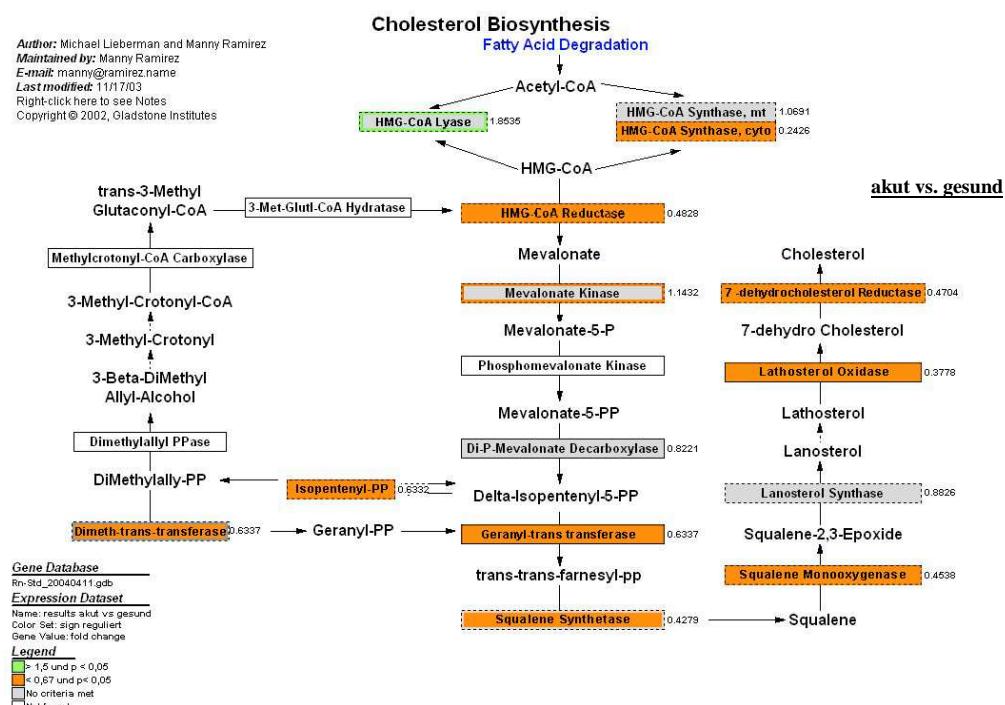
Tabelle 15: Übersicht über die Expression der Gene der Cholesterin-Biosynthese während der EAE. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis der Expression der Gene in den verschiedenen EAE-Phasen zu den gesunden, naiven Ratten, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$. Die nicht stringent regulierten Gene sind grau unterlegt.

⁽¹⁾: ausschließlich im ZNS exprimiert (nicht in den Lymphknoten).

Ergebnisse

Dabei erstreckt sich die Abnahme dieser Transkripte über den gesamten untersuchten Zeitraum der EAE; also auch auf die Remission. Die irreversible Synthese von Mevalonat aus HMG-CoA, katalysiert durch das Enzym HMG-CoA Reduktase, ist der entscheidende Schritt für die Cholesterin Biosynthese, und die HMG-CoA Reduktase ist das in diesem Stoffwechselweg am konstantesten im untersuchten EAE-Verlauf supprimierte Gen.

Eine Verminderung des Transports von Cholesterin lässt sich im Gegensatz dazu kaum feststellen, von einigen Ausnahmen abgesehen sind die Moleküle, die an dem Transport von Cholesterin involviert sind, kaum reguliert und weisen keinen einheitlichen Trend auf (Tabelle 16). Nur das Molekül *Oxysterol binding protein-like 1A*, das an der intrazellulären Verteilung von Cholesterin beteiligt ist, für das Apolipoprotein A-I, das speziell im ZNS den interzellulären Transport – auch über die Bluthirnschranke – ermöglicht (Quan et al., 2003) sowie für das Molekül *ATP-binding cassette, sub-family A member 2*, dessen Expression auf aktiven, myelinisierenden Oligodendrozyten gezeigt werden konnte (Tanaka et al., 2003), werden signifikant herunterreguliert; allerdings auch nur in der akuten Phase der EAE. Eine Bestimmung des Cholesteringehalts des ZNS ergab, dass die Cholesterin-Konzentration im Rückenmark von EAE-Tieren während der EAE leicht erhöht ist (Abb. 29).



Erster Teil der Abbildung 28: Erklärung auf folgender Seite

Ergebnisse

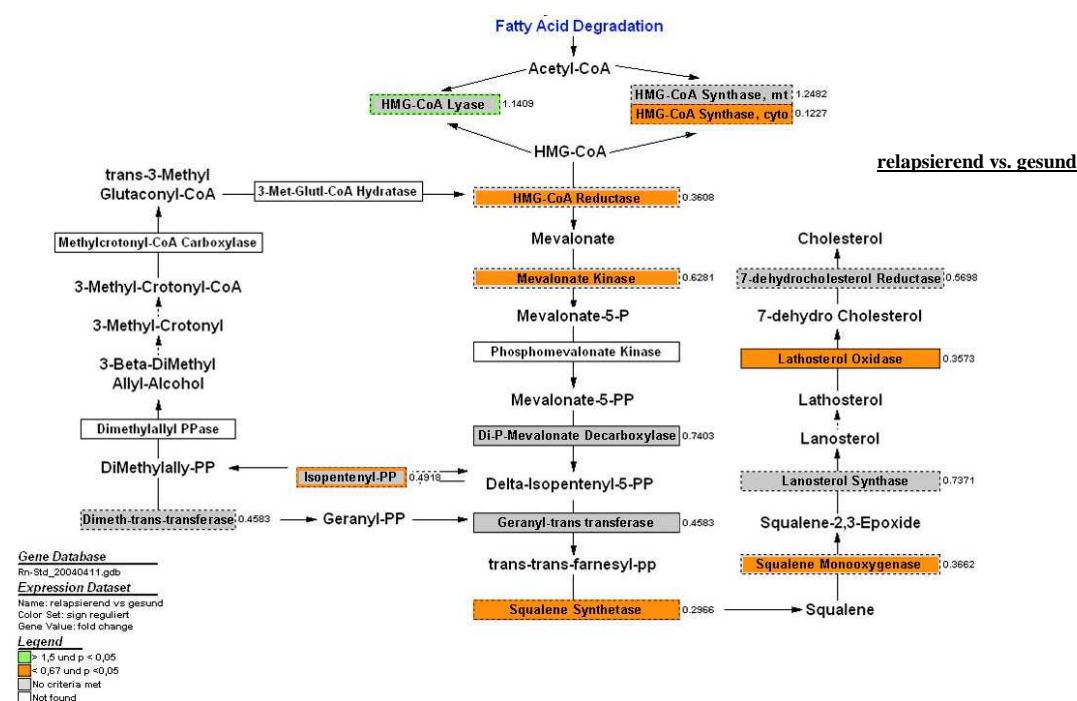
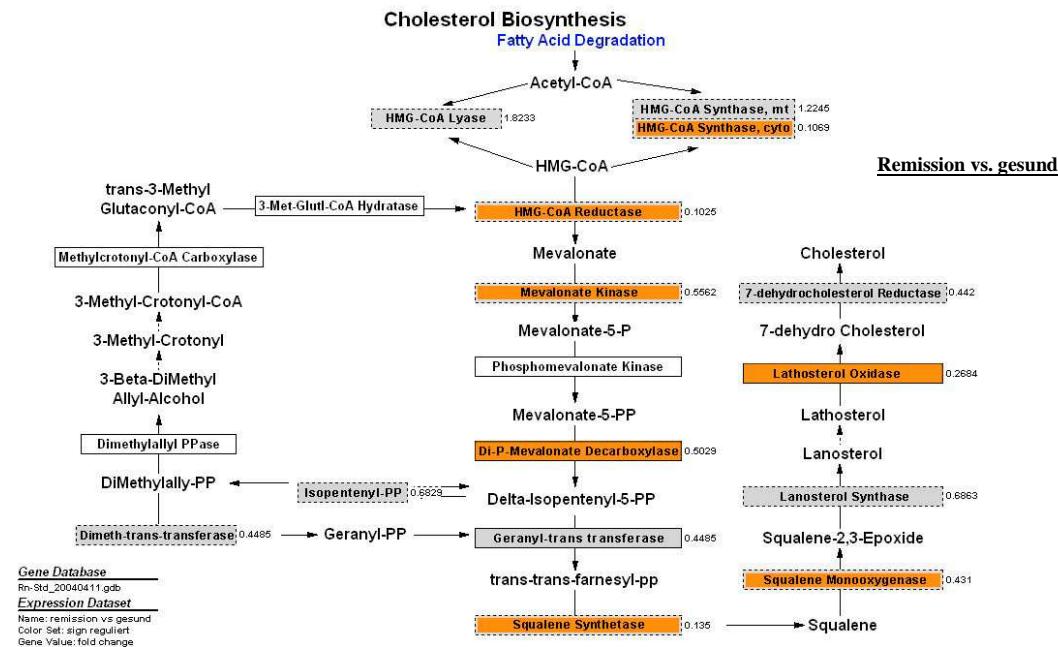


Abb. 28: Regulation von Genen der Cholesterinbiosynthese - analysiert mit GenMAPP 2.0. Weiß markierte Gene bedeuten, dass auf den benutzten DNA-Chips keine entsprechenden Sondensätze für das jeweilige Gen identifiziert werden konnten. Grau unterlegte Gene lassen sich zwar auf den Chips finden, entsprechen aber nicht den angegebenen Kriterien für eine Regulation. Grün unterlegte Gene sind mindestens 1,5fach hochreguliert und mit einem p-Wert von kleiner gleich 0,05. Rot unterlegte Gene sind mindestens 1,5fach herunterreguliert und mit einem p-Wert von kleiner oder gleich 0,05. Bei Feldern die rot oder grün umrandet sind, ist jeweils nur ein Teil der Sondensätze für das jeweilige Gen entsprechend reguliert.

Seite 75: akut gegen gesund.

Seite 76 oben: Remission gegen gesund

Seite 76 Mitte: relapsierend gegen gesund.

Ergebnisse

Transkripte des Cholesterin Transports	Sondensatz	akut – gesund	Remission – gesund	relapsierend – gesund
Apolipoprotein A-I	M00001_i_at	0,35*	0,86	1,29
Apolipoprotein A-II	X03468_at	1,21	0,91	1,21
Apolipoprotein A-IV	M00002_at rc_AI113166_s_at	1,92 0,93	0,68 0,69*	1,77 0,84*
Apolipoprotein B	M14952mRNA_at M21842_at M27440_at rc_AA997806_at	0,88 1 0,28 0,87	0,56 1 1,39 1,27	0,69 1 0,83 1,04
Apolipoprotein C-I	X15512_at	5,99	1,63	4,87
Apolipoprotein C-III	rc_AI169758_at	0,89	0,81	1,01
Apolipoprotein C-IV	rc_AA945171_at	1,36	1,29*	1,15
Apolipoprotein D	X55572_at	0,88	0,79	0,91
Apolipoprotein E	X04979_at S76779_s_at	1,42 1,5	1,25 1,06	1,34 1,62
Apolipoprotein M	rc_AA893213_at	1,21	1,09	0,98
Cellular retinoic acid binding protein 2	U23407_at	1,67	1,19	1,37
Lipopolysaccharide binding Protein	L32132_at	1,54	0,73	1,1
Low density lipoprotein receptor	rc_AI043724_at rc_AI070411_at X13722_at	0,91 0,82 1,15	0,58 0,44 0,85	0,61* 0,58 0,94
Phosphatidylcholine transfer Protein	AF040261_s_at	1,43	1,02	1,28
Fatty acid transport Protein (Slc27a1)	U89529_at	0,8	0,85	0,94
Steroidogenic acute Regulatory Protein	AB001349_at AB006007_s_at rc_AA892260_at rc_AA892260_g_at	1,02 1,11 1,55* 2,13	1,07 0,8 1,13 1,35	0,96 1,01 1,3 1,35*
Very low density lipoprotein receptor	L35767_at rc_AI171674_at	0,72 0,46	1,02 1,05	0,82 0,93
Glutamate oxaloacetate transaminase 2	M18467_at rc_AA892012_at rc_AA892012_g_at	0,93 1 0,99	0,58 1 0,27*	0,69 1 0,71
Scavenger receptor class B, member 1 (SR-BI)	D89655_at AF071495_s_at rc_AA874843_s_at	1,36 1,16 1,25	1,05 0,63 0,90	1,26 1,1 1,11
Carnitine palmitoyltransferase 1b	AF063302mRNA#1_s_at AF063302mRNA#3_s_at D43623_at D43623_g_at	0,86 0,75 1,21 1,07	0,60 0,81 0,88 0,92	0,88 0,88 0,92 0,93
ATP-binding cassette, subfamily G member 1 (ABC G1)	rc_AA944183_at rc_AI179131_at	1,57 2,19*	1,68 2,19*	1,37 1,92
ATP-binding cassette, sub-family A member 1 (ABC A1)	rc_AI171534_at	1,82	1,09	1,61
ATP-binding cassette, sub-family A member 2 (ABC A2)	rc_AA998560_at	0,51*	0,74*	0,87
PDZ domain containing 1	AF013145_at rc_AI232999_at	1,26 0,72	0,82 0,88	1,09 0,89
Acyl-Coenzyme A: Cholesterol acyltransferase	D86373_s_at	2,39	0,83	1,66
MLN64	AB001349_at AB006007_s_at rc_AA944269_at	1,02 1,11 0,88	1,07 0,8 1,67	0,96 1,01 1,18
Sterol carrier protein 2	M58287_s_at M62763complete_seq_at	0,76 0,79	0,38 0,88	0,85 1,08

Ergebnisse

Oxysterol-binding protein-like protein 6 isoform b	rc_AA901035_at rc_AI070464_at	0,86 1,92	1,06 1,36	1,04 1,18
Oxysterol binding protein-like 1A	rc_AA963459_at rc_AI070135_at rc_AI070882_at rc_AI137224_at	0,65 0,54 0,57 0,58*	1,82 0,47 0,82 0,39*	1,07 0,70 0,82 0,70
Oxysterol-binding protein-like protein 5	rc_AI070093_at	0,69	0,58	0,60
Oxysterol-binding protein-like protein 9 isoform f	rc_AI234872_at rc_AI237694_at	1,06 1,18	0,60 0,45*	0,72** 0,53*
Caveolin-1	Z46614cds_at	1,17	0,81	1

Tabelle 16: Übersicht über die regulierten Gene für den Transport von Cholesterin. Dargestellt ist jeweils das

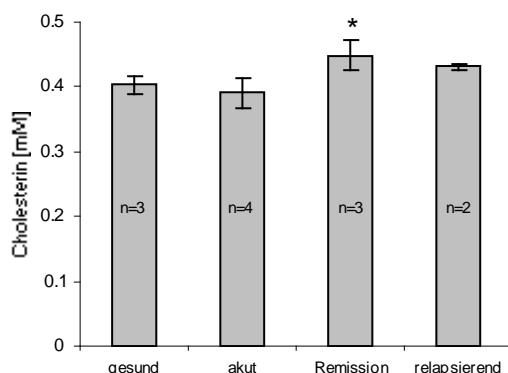


Abbildung 29: Cholesterin-Konzentration in RM-Proteinextrakten von DA-Ratten aus den verschiedenen Krankheitsphasen; *: $p \leq 0,05$.

Verhältnis der Expression der Gene in den verschiedenen EAE-Phasen zu den gesunden, naiven Ratten, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Transkripte für Ionenkanäle, -transporter und Gene des Neurotransmitter-Metabolismus

Eine große Anzahl von Transkripten, die im Zusammenhang mit der Produktion, dem Transport oder der Ausscheidung von Neurotransmittern stehen, sind in der akuten Phase stark und signifikant herunterreguliert. In der Remission kommt es nicht nur im Vergleich zur

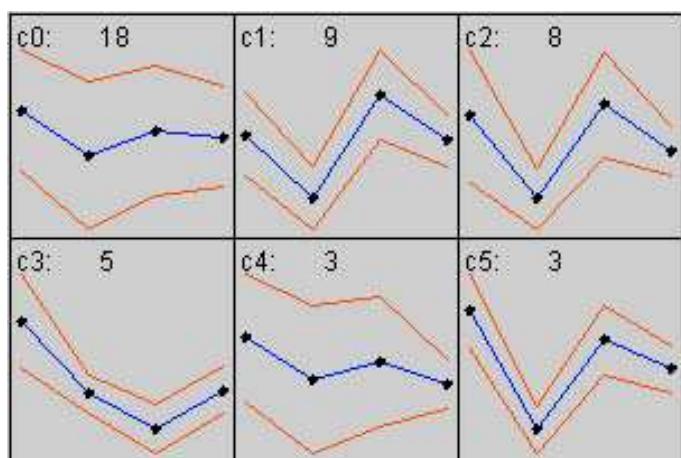


Abbildung 30: Ergebnis einer SOM-Analyse der Gene, die mit dem Metabolismus von Neurotransmittern und Ionenkanälen oder -transportern assoziiert sind - ausgehend von einer 2x3-Matrix. Links oben in jedem Quadrat befindet sich die Nummer des Clusters. Oben in der Mitte ist die Anzahl der Gene in dem jeweiligen Cluster zu finden. Die blauen Linien kennzeichnen die durchschnittl. Expressionsprofile jedes Clusters, die roten die äußeren Grenzen. **1** entspricht dem Durchschnitt der gesunden Tiere, **2** der Tiere aus der akuten Phase, **3** der Tiere aus der Remission und **4** derjeniger Tiere aus der relapsierenden Phase der EAE.

Ergebnisse

akuten Phase, sondern häufig auch im Vergleich zu den gesunden Tieren zu einer starken Erhöhung der Transkriptmenge - besonders *Synaptic vesicle glycoprotein 2b*, das auch in dem Lymphknotengewebe exprimiert war, und dem *Solute carrier family 18, member 3*. In der relapsierenden Phase steigt die Expression der meisten Molekülen wieder (Tabelle 17).

Transkripte im Zusammenhang mit Neurotransmittern	Sondensatz	akut – gesund	Remission – gesund	relapsierend – gesund
Vesicular GABA transporter (VGAT) ⁽¹⁾	AF030253_at	0,37*	0,84	0,56*
Complexin 1 ⁽¹⁾	D70817_at	0,28*	0,25*	0,40**
Synaptic vesicle glycoprotein 2 a	L05435_at	0,47*	1,66	1,1
Synaptic vesicle glycoprotein 2 b	L10362_at rc_AI639484_at rc_AA942964_at	0,30* 0,48 3,02	0,67 2,13 7,78*	0,44* 1,28 0,74
Clathrin, light polypeptide (Lcb) ⁽¹⁾	M15883_at M15833_g_at rc_AA874955_s_at rc_AI102411_at rc_AI172090_s_at	0,60 1,01 1,15 0,95 0,71	0,35* 1,07 1,27 1,37 0,22*	0,58 0,91 1,13 1,61 0,49
Glycine transporter 1 ⁽¹⁾	L13600_at rc_AA943735_at rc_AA819842_at	0,52 0,30** 1,11	0,57 1,27 1,14	0,72 0,98 1,19
Transporter-like Protein (Ctl 1)	rc_AI105205_at AA801076_at rc_AI236539_at	0,79 1,64 0,65*	2,02* 1,95* 0,79	1,45 1,54 1,2
GABA transporter Protein	rc_AI228669_at	0,28*	1,52*	1,04
Synaptosomal associated Protein (Snap25) ⁽¹⁾	U56261_s_at rc_AA943153_at AB003991_at AB003991_g_at AB003992_s_at	0,80 0,52* 0,66 0,34* 0,35*	0,79 0,88 0,56 0,23 0,31*	0,75 0,74 0,73 0,41 0,42*
Growth factor receptor bound Protein 14 (Grb14)	AF076619_at	0,33**	0,59*	0,51**
Secretory granule neuroendocrine Protein 1 ⁽¹⁾	M63901_g_at	0,40*	0,91	0,79
Calcium-independent alpha latrotoxin receptor homolog 3 (CirI3) ⁽¹⁾	rc_AA943965_at rc_AA943965_g_at	0,44* 0,53*	1,06 0,80	0,85 0,70*
Synapsin 2 ⁽¹⁾	M27925_at rc_AI145494_at rc_AI145494_g_at	0,21** 0,32* 0,46*	0,52* 1,17 0,73	0,40** 0,68 0,60*
Vesicle-associated membrane Protein 1 (Vamp1) ⁺⁺	M24104_at M24104_g_at rc_AI171731_s_at rc_AI229196_at rc_AI229196_g_at	0,34* 0,41 0,28** 0,39** 0,51*	0,28 0,34 0,16* 0,52* 0,87	0,49 0,56 0,35* 0,47* 0,67
Synaptosomal-associated Protein 91 (Snap 91) ⁺⁺	X68868_s_at rc_AI136849_at	0,66 0,46*	0,79 1,1	0,75 0,74
Myc box dependent interacting Protein 1	rc_AI102031_at rc_AI102031_g_at rc_AI059955_s_at	0,42* 0,52* 0,61	0,60 1,13 0,57*	0,75 0,99 0,82*
Clathrin-associated Protein 17	U75917_at U75917_g_at	1,2 1,46	0,46* 0,72	0,89 0,98
Catechol-O-Methyltransferase (Comt)	M60753_s_at M93257_s_at rc_AI070314_at	3,33* 3,78* 0,57	1 2,29** 0,65	2,41 2,98 0,73
Solute carrier family 18, member 3	U09211at	0,71	2,21**	1,46
Solute carrier family 1, member 3 ⁽¹⁾	S59158_at S75687_s_at X63744_at	1,49 1,28 0,93	1,48 0,58 1,37	1,52* 0,98 1,11

Ergebnisse

	X63744_g_at rc_AA899125_at	1,25 1,61	0,91 4,88**	1,17 2,24
Catechol-O-methyltransferase	M60753_s_at	3,33**	1	2,41

Tabelle 17: Übersicht über die regulierten Gene, die mit Neurotransmitter assoziiert sind. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis zwischen den verschiedenen EAE-Phasen und gesunden, naiven Ratten, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ⁽¹⁾: ausschließlich im ZNS exprimiert, ⁺⁺: in MOG-Peptid-induzierter EAE von C57Bl/6-Mäusen als ZNS-spezifisch identifiziert und während akuter Phase herunterreguliert.

Ebenso sind viele Transkripte reguliert, die für Ionenkanalproteine kodieren. Abgesehen von *Myosin regulatory light chain* sind alle entsprechenden Transkripte in der akuten Phase reduziert, erholen sich wieder während der Remission und nehmen in der relapsierenden Phase wiederum ab (Tabelle 18). Alles in allem verläuft die Regulation dieser Gene äußerst homogen, weil alle in der akuten Phase herunterreguliert sind, und sich die Expression von 90% dieser Gene in der Remission wieder steigert (Abbildung 30).

Transkripte für Kanalproteine	Sondensatz	akut – gesund	Remission – gesund	relapsierend – gesund
Gap junction Protein, beta 6 (connexin 30) ⁽¹⁾	rc_AI059426_at	0,12*	0,66	0,83
Sodium channel, voltage-gated, type 1, alpha polypeptide ⁽¹⁾	M22253_at	0,38*	1,37	0,90
Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 1	X57514_at	0,39*	0,57	0,56
Plasmolipin ⁽¹⁾	Z49858_at	0,46**	0,38**	0,63
Similar to JNK-interacting Protein-2 (LOC315220), mRNA ⁺	rc_AI145044_at	0,57*	1,07	0,82
Glutamate receptor, ionotropic, 2 ⁽¹⁾	M38061_at rc_AA957445_at	0,42* 0,84	1,26 1,89*	0,77 1,12
Similar to NEDD8 ultimate buster-1 (LOC296731), mRNA	rc_AI232313_at	0,94	0,47*	0,62
Sodium channel I ⁽¹⁾	M22253_at	0,37*	0,90	1,37
ATPase, Na+K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	M28647_g_at M74494_g_at rc_AI072060_s_at	0,78 0,73 0,93	0,58 0,53 0,45	0,40* 0,12** 0,35*
ATPase, Na+K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	rc_AI177026_at	0,27*	0,86	0,95

Tabelle 18: Übersicht über die regulierten Gene für Ionenkanäle. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis zwischen den verschiedenen EAE-Phasen und gesunden, naiven Ratten, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ⁽¹⁾: ausschließlich im ZNS exprimiert.

Neuroregeneration in der EAE der DA-Ratte

39 Sondensätze wurden identifiziert, die laut einer Pathway-Analyse mit NetAffx bereits im Zusammenhang mit der Neuroregeneration beschrieben wurden und signifikant in dieser Studie reguliert sind. Eine SOM-Analyse ergab, dass zehn dieser Gene (*Cluster 1* sowie acht der Gene des *Clusters 2*) ein Profil zeigen, bei dem es zu einer Aufregulation in der akuten Phase und einer darauf folgenden Expressionerniedrigung während der Remission kam. In

Ergebnisse

der relapsierenden Phase bleibt bei den Genen dieser Cluster die Expression mehr oder weniger unverändert (Abbildung 31). Die restlichen 29 der mit Regeneration assoziierten Transkripte verhält sich spiegelbildlich zu der ersten (*Cluster 0, 3, 4, 5* sowie *9* der Gene in *Cluster 2*). Das heißt, es kommt in der akuten Phase zu einer starken Expressionerniedrigung und danach zu einer Erhöhung. Die relapsierende Phase bildet in diesen *Clustern* keinen einheitlichen Trend aus. Die Gene in den *Clustern 0* und *6* verändern ihre Expression in der relapsierenden Phase nicht mehr. Die Gene in den *Clustern 3* und *5*, werden in dieser Phase weniger stark exprimiert.

Die während der akuten Phase aufregulierten Gene, die in den *Clustern 1* und *2* zu finden

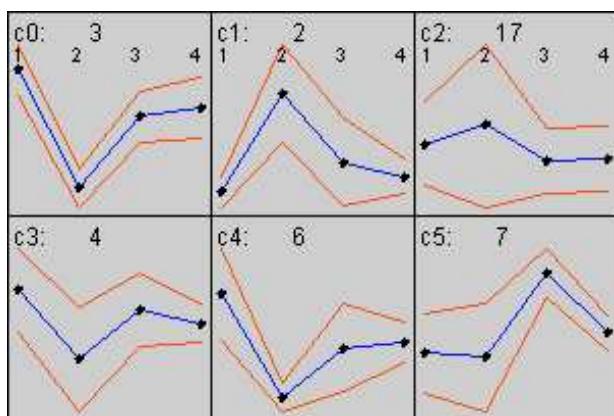


Abbildung 31: Ergebnis einer SOM-Analyse der Neuroregeneration-Gene mit Genecluster 2.0 – ausgehend von einer 2x3-Matrix. Links oben in jedem Quadrat befindet sich die Nummer des Cluster. Oben in der Mitte ist die Anzahl der Gene in dem jeweiligen Cluster zu finden. Die blauen Linien kennzeichnen die durchschnittlichen Expressionsprofile jedes Clusters, die roten die Grenzen. **1** entspricht dem Durchschnitt der gesunden Tiere, **2** der Tiere aus der akuten Phase, **3** derjenigen aus der Remission und **4** der Ratten aus der relapsierenden Phase der EAE.

sind, befinden sich in Tabelle 19 – ebenso wie diejenigen, die in der akuten Phase herunterreguliert sind und in *Clustern 0, 3 und 4* zusammengefasst sind.

aufregulierte Transkripte für Neuroregeneration	Sondensatz	akut – gesund	Remission – gesund	relapsierend – gesund
In akuter Phase aufreguliert				
Fibrillin-1	rc_AA997765_at rc_AA859321_at	2,28* 2,74*	1,1 0,85	1,1 1,14
Neuropilin	AF016296_at	2,31*	1,78	1,24
ADP-ribosylation factor 6	rc_AA944324_at	2,75*	1,81	1,5
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	rc_AI014091_at rc_AI176963_at	2,9* 2,93**	4,71* 1,88	2,16 1,13
C-fos oncogene	rc_AI176185_at rc_AI072183_at X06769cds_at X06769cds_g_at	3,49* 3,08* 1,47 1,7	1,79 2,92 0,70 1,01	1,24 1,49 1,03 1,24
Ninjurin 1	U72660_at	3,99**	1,33	2,06
Guanine deaminase (Cypin)	rc_AA859837_at rc_AA859837_g_at rc_AI236955_at rc_AA817726_at rc_AA964867_at U03629_at	8,19 4,48* 2,61 8,73* 3,02 1,26	2,48 2,41* 1,62 3,6* 1,12 1,17	1,49 1,48 1,08 1,61 1,26 1,23
Tenascin C	U09361_s_at U15550_at	6,11** 2,61	1,63 0,70	1,97* 1,07

Ergebnisse

	U09401_s_at	1,66	0,94	0,97
Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (Versican)	AF072892_s_at	6,12*	1,69	1,73
In akuter Phase herunterreguliert				
Fasciculation and elongation protein zeta-1 (Fez1) ⁽¹⁾	U63740_at	0,22**	0,78	0,63
Calcium/calmodulin-dependent Protein kinase (CaM kinase) II gamma ⁽¹⁾	J04063_at M16960_s_at	0,26* 1,13	0,30 1,06	0,44 1,34
Myelin-associated oligodendrocytic basic Protein ⁽¹⁾	D28810_at D28810_g_at D28111_at D28111_g_at	0,31 0,25* 0,32* 0,43*	0,93 0,18* 0,52 0,77	1,12 0,55 0,60 0,75
UDP-Glucuronosyl-transferase 8	rc_AI228110_s_at U07683_at	0,34* 0,97	1,23 0,78	0,98 0,79
Guanine nucleotide binding Protein, alpha o	M17526_at	0,34*	0,83	0,68*
Lifeguard ⁽¹⁾	AF044201_at	0,37*	0,60	0,61*
Proteolipid Protein	M25888_at rc_AI070277_s_at rc_AI072770_s_at	0,62 0,47* 0,40*	1,07 0,8 0,75	0,98 0,87 0,82
Endothelin receptor type B ⁽¹⁾	X57764_s_at S65355_at S65355_g_at	0,47* 0,49* 0,47*	2,95* 3,45* 1,6	1,42 1,64 1,09
Microtubule-associated Protein 2 ⁽¹⁾	U30938_at X17682_s_at rc_AI228850_s_at	0,41* 0,29* 1,2	1,35 1,57 1,41	1 0,97 1,27
Neuronatin	U08290_at	0,42*	0,97	0,81

Tabelle 19: Übersicht über die regulierten Gene, von denen bekannt ist, dass sie mit der Neuroregeneration assoziiert sind. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis zwischen den verschiedenen EAE-Phasen und gesunden, naiven Ratten, *: p ≤ 0,05, **: p ≤ 0,01, ⁽¹⁾: ausschließlich im ZNS exprimiert.

In der Gruppe der mit der Neuroregeneration-assozierten Gene ist kein einheitlicher Trend zu erkennen, wie bei den Myelin- oder den Neurotransmitter-spezifischen Genen. Dennoch sind deutlich mehr dieser Gene in der akuten Phase herunterreguliert (~75%) als aufreguliert. Unter den aufregulierten Transkripten zeigen die Gene, die im Cluster 1 zusammengefasst wurden (*Guanine demaminase* und *Tenascin C*), zusammen mit dem Gen für *Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (Versican)* das ausgeprägteste Expressionsprofil. Das heißt, dass diese Gene den größten Anstieg in der akuten Phase und den größten Abfall in der Remission aufweisen. Von den Genen, deren Expression in der akuten Phase erniedrigt ist, haben die Transkripte, die dem *Endothelin receptor type B* entsprechen, den größten Anstieg während der Remission. In Abbildung 31 ist zudem erkennbar, dass in der Remission im Vergleich zu der akuten und relapsierenden Phase mehr Neuroregenerationsgene aufreguliert sind.

Die EAE läuft einher mit verstärkter Protein-Degradation

Mehrere Sondensätze, die für Bestandteile des Proteasoms, für Proteasen oder für am Proteinabbau beteiligte Molekülen stehen (besonders Kathepsine und Metalloproteininasen), waren besonders während der akuten Phase der EAE im ZNS stärker exprimiert als bei gesunden Tieren (Tabelle 20).

Mit Proteinabbau assoziierte Transkripte	Sondensatz	akut – gesund	Remission - gesund	relapsierend - gesund
Proteasome subunit, alpha type 1 (Psma1)	rc_AI009111_at D90265_s_at	1,14 1,49	1,08 1,38	1,01 1,15
Proteasome subunit, alpha type 2 (Psma2)	E03358cds_at rc_AI170403_at	1,21 1,38*	0,37* 2,28*	0,78 1,55
Proteasome subunit, alpha type 3 (Psma3)	rc_AI171738_at	1,05	0,99	1,05
Proteasome subunit, alpha type 5 (Psma5)	rc_AI169479_s_at D10756_at D10756_g_at	1,75* 1,5* 1,69	0,70* 0,61* 1,81	0,91 0,91 1,48
Proteasome subunit, alpha type 6 (Psma6)	rc_AI112633_s_at D10755_s_at rc_AA799492_at rc_AI071208_at	1,97 1,42* 1,21 1,23	0,42* 1,13 0,88 1,26	0,62 1,19 0,93 1,23
Proteasome subunit, alpha type 7 (Psma7)	D30804_at D30804_g_at	1,57 1,6*	1,03 1,79*	1 1,32
Proteasome subunit, beta type 1 (Psmb1)	rc_AA849722_at	1,24	1,15	1,09
Proteasome subunit, beta type 2 (Psmb2)	D21799_at D21799_g_at	1,54 1,24	0,95 1,15	1,1 1,09
Proteasome subunit, beta type 3 (Psmb3)	D21800_at D21800_g_at rc_AI235296_at	1,41* 1,33 0,97	0,68 1,01 0,88	1,05 1,16 0,97
Proteasome subunit, beta type 4 (Psmb4)	rc_AI172162_at L17127_at L17127_g_at	1,42 1,14 1,22	1,6* 0,83 0,99	1,35 1,04 1,09
Proteasome subunit, beta type 5 (Psmb5)	D45247_at D45247_g_at rc_AA891226_s_at rc_AI011563_s_at	1,04 1,24 1,11 1	0,30* 1,26* 0,82 0,17*	0,83 1,11 0,96 0,91
Proteasome subunit, beta type 6 (Psmb6)	D10754_at D10754_g_at rc_AA925552_at	1,04 1,13 0,93	0,37* 0,77 0,56	0,72 0,98 0,84
Proteasome subunit, beta type 7 (Psmb7)	rc_AI104300_at	1,22	1,14	1,03
Proteasome subunit, beta type 8 (Psmb8 oder Lmp7)	rc_AI178629_s_at D10729_s_at	12,52* 9,82**	4,33 1,77	2,45 2,74
Proteasome subunit, beta type 9 (Psmb9 oder Lmp2)	D10757_at D10757_g_at rc_AI012340_s_at rc_AI177481	1,79 11,62** 14,72** 8,61*	0,96 3,4 2,39 1,16	1,2 2,37 2,69 1,85
Proteasome activator subunit 1 (Psme1 oder PA28 α)	D45249_at D45249_g_at rc_AA848487_s_at rc_AA799484_at	1,82** 4,02* 3,62** 1,04	0,96 2,47 1,32 1,03	1,21 2,13** 1,67 0,99
Proteasome activator subunit 2 (Psme2 oder PA28 β)	rc_AI011981_at rc_AI011981_g_at	1,3 5,47**	1,14 2,2*	1,31 1,57*

Ergebnisse

	rc_AA851169_s_at D45250_s_at	4,49** 1,37	1,27 0,67	1,23 0,99
Proteasome 26S subunit, ATPase 1 (Psmc1)	D50696_at	0,93	1,05	0,91
	rc_AI045861_at	1,21	1,1	1,67*
Proteasome 26S subunit, ATPase 2 (Psmc2)	U13895_s_at	0,83	0,18	0,59
	D50694_at	1,1	1,14	1,08
Proteasome 26S subunit, ATPase 3 (Psmc3)	U77918_at	1,18	0,56*	0,81
	D50695_at	1,26	0,69	0,84
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 (Psmd1)	rc_AA859869_s_at	1,14	1,31	0,90
	AJ006340_s_at	0,95	0,77	0,85
	U57050_g_at	1,13	1,21	1,11
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 (Psmd4)	rc_AA799887_s_at	1,06	0,64	0,72
	rc_AI236731_at	0,94	0,88	0,85
	AB017188_at	0,85	0,60	0,88
	AB017188_g_at	1,02	1,03	0,88
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9 (Psmd9)	rc_AI175576_at	0,91	1,16	0,95
	rc_AI059501_at	1,09	1,24	1,15
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10 (Psmd10)	rc_AA957491_at	0,93	1,05	1,03
	rc_AI172453_at	0,92	1,26	1,05
	AB022014_at	0,86	0,61	0,93
Ribopherin I (Rpn1)	X05300_at	1,28	1,55	1,19
Ribopherin II (Rpn2)	X55298_at	1,86*	0,97	1,1
	rc_AA875324_at	1,08	0,99	1,03
H2A histone family, member Z (H2AZ)	M37584_at	2,22**	1,65	1,34*
Ubiquitin C	D17296_at	0,95	0,82	0,92
Ubiquitin-conjugating enzyme E2b (Ube2b)	rc_AA799612_at	0,88	1,09	0,97
	M62388_at	1,03	0,70	0,93
	M62388_g_at	1,06	0,70*	0,94
	rc_AI044525_at	1,14	1,69	1,19
Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 4 (Ube2d2)	rc_AI233359_at	0,75	1,11	0,87
	rc_AI104247_at	0,94	0,79	0,72*
	U13176_at	0,94	0,37**	0,55
	U56407_at	1	1	1
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 G1 (Ube2g1)	AF099093_at	0,84	0,60	0,75
	AF099093_g_at	0,68	0,33	0,65
	rc_AA851376_at	0,97	1,88*	1,28
	rc_AA996896_at	1,82	1,09	1,14
	rc_AI229984_at	1,04	2,18*	1,32
Ubiquitin-conjugating enzyme E2N (Ube2n)	rc_AA925340_at	1,57	1,7*	1,26
Cathepsin B	X82396_at	2,82*	1,56	2
Cathepsin C	rc_AA926360_at	35,74*	7,41**	7,42*
	D90404_at	23,15*	1,38	4,42
	D90404_g_at	10,62**	2,87*	2,81*
Cathepsin D	X54467_at	3,02**	1,47	3,29
	rc_AI235585_s_at	1,93*	1	2,07
Cathepsin E	D45187_s_at	1,55	1,81*	1,71
Cathepsin H	M38135_at	2,23	1,85	2,34*
Cathepsin K	rc_AA925246_at	2,73*	2,3	2,11
Cathepsin L	rc_AI176595_s_at	1,92*	1,28	1,87*
Cathepsin L2 (Precursor Y,U)	rc_AI230591_at	3,57**	1,36	1,78
	rc_AI237380_at	1,33	1,04	1,29
Cathepsin S	L03201_at	2,49*	2,19**	2,36**
Cathepsin Y	rc_AA818798_at	11,76*	3,01*	5,28*
	rc_AA851184_s_at	16,98*	5,11*	7,98
Interferon- γ inducible Protein 30	rc_AA852018_at	9,96**	5,46**	5,38*
Lysosomal-associated Protein 5	rc_AA925353_at	4,61*	1,49	3,83

Ergebnisse

	rc_AI234133_at	7,85**	2,22*	3,56*
Signal peptidase complex 18kD	L11319_at	2,12	0,61	1,34
	L11319_g_at	2,14*	0,88	1,3
Matrix metalloproteinase 14, membrane-inserted	rc_AI070584_at	3,97**	1,67*	1,33
A disintegrin and metalloproteinase with Thrombospondin motifs 1 (ADAMTS-1)	rc_AI171159_at	3,43	1,08	0,95
Matrix metalloproteinase 2	U65656_at	0,47	0,50	0,76
	X71466_at	1,21	0,93	1,01
Matrix metalloproteinase 9	U24441_at	1,98	1,21	1,06
Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	AJ007288_at	2,7	1,76	1,41
Leucyl-specific aminopeptidase PILS	rc_AI171503_at	3,35**	1,8*	1,42
	rc_AI044567_at	2,04	0,71	1,08
	rc_AI044567_g_at	2,16	1,97*	1,76
Peptide/histidine transporter PHT2	rc_AI172497_at	2,86	1,47	1,69
Dipeptidylpeptidase 7	rc_AI232062_at	2,34*	1,65*	2,04
Neural F box protein NFB42 ⁽¹⁾	AF098301_at	0,48*	0,85	0,97
Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 ⁽¹⁾	rc_AA859882_s_at	0,45**	0,60*	0,64*
	D10699_at	0,34	0,26**	0,52*
	D10699_g_at	0,32*	0,36*	0,58*

Tabelle 20: Übersicht über die regulierten Transkripte, die mit dem Abbau von Proteinen assoziiert sind. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis zwischen den verschiedenen EAE-Phasen und gesunden, naiven Ratten, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ⁽¹⁾: ausschließlich im ZNS exprimiert.

Eine Pathway-Analyse bezüglich des Abbaus von Proteinen durch das Proteasom ergab, dass während der akuten Phase besonders Gene der α -und β -Untereinheiten des 20S Proteasoms und des *activators of 20S complex* aufreguliert waren, während die Gene für das *19S Cap* (auch: *PA700*), dessen Verbindung mit dem 20S Proteasom zur Bildung des Ubiquitin-abhängigen 26S Proteasom führt, unverändert blieben (Abbildung 32). Das 20S Proteasom kommt auch ohne *PA700* im Zytoplasma vor, wo es nur teilweise oder falsch gefaltete Proteine bindet und deren Aggregation verhindert (Yano et al., 2004). Zudem sind in der gleichen Phase hauptsächlich diejenigen β -Untereinheiten des 20S Proteasoms aufreguliert (*Proteasome subunit, beta type 8 (Psmb8)* und *9 (Psmb9)*), die nur in den so genannten Immunoproteasomen vorkommen, die in $IFN\gamma$ -stimulierten Zellen entstehen und speziell für die Generierung von Peptiden zur Präsentation auf MHC-Klasse I-Molekülen geeignet sind (Kloetzel and Ossendorp, 2004). In der Remission kommt es im Vergleich zur akuten Phase zu einer generellen Erniedrigung der Expression von Proteasom-Bestandteilen und in der relapsierenden Phase wieder zu einem leichten Anstieg.

Ergebnisse

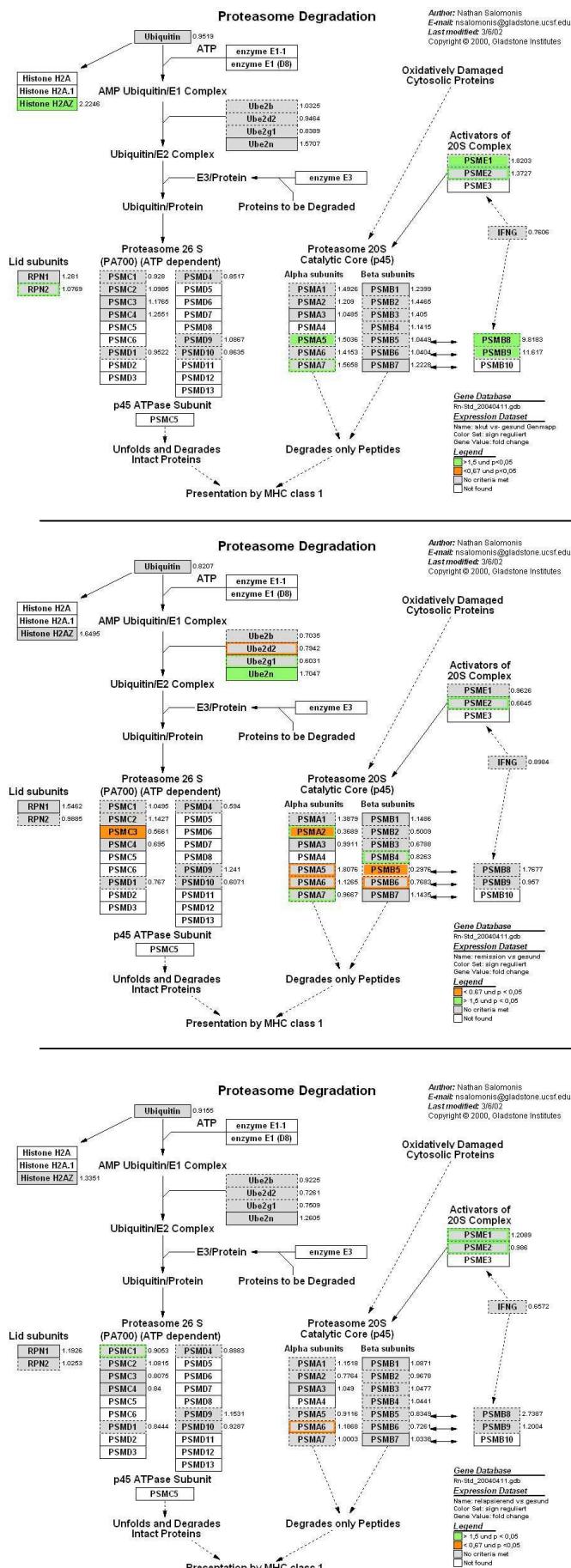


Abbildung 32: Regulation von Genen, die mit der Funktion des Proteasoms assoziiert sind, analysiert mit GenMAPP 2.0 (Gene MicroArray Pathway Profiler). Weiß markierte Gene bedeuten, dass auf den benutzten DNA-Chips keine entsprechenden Sondensätze für das jeweilige Gen identifiziert werden konnten. Grau unterlegte Gene lassen sich zwar auf den Chips finden, entsprechen aber nicht den angegebenen Kriterien für eine Regulation. **Grün** unterlegte Gene sind mindestens 1,5fach hochreguliert und mit einem p-Wert von kleiner gleich 0,05 reguliert. **Rot** unterlegte Gene sind mindestens 1,5fach herunterreguliert und mit einem p-Wert von kleiner gleich 0,05 reguliert. Bei Feldern die rot oder grün umrandet sind, ist ein Teil Sondensätze für das jeweilige Gen entsprechend reguliert. Erklärungen der Abkürzungen befinden sich in Tabelle 20.

oben) Vergleich der Expression in der akuten Phase mit gesunden Tieren.

Mitte) Vergleich der Expression in der Remission mit gesunden Tieren.

unten) Vergleich der Expression in der relapsierenden Phase mit gesunden Tieren.

Verstärkte Expression von MHC-Molekülen

Die Expression von Molekülen, deren Funktion es ist, Antigene auf der Oberfläche für Immunzellen zu präsentieren, war homolog zu denen Genen für Protein abbauende Enzyme in der EAE verstärkt (Tabelle 21). Besonders stark sind die Gene für Major histocompatibility complex MHC-Klasse II Moleküle aufreguliert, was zu einem großen Teil durch die eindringenden Makrophagen und Dendritischen Zellen bedingt ist, aber auch dadurch, dass residente Mikrogliazellen durch die inflammatorischen Prozesse während der EAE aktiviert werden und vermehrt Antigene auf MHC-Klasse II-Molekülen transportieren (Juedes and Ruddle, 2001).

MHC-Moleküle	Probeset	akut - gesund	Remission - gesund	relapsierend - gesund
RT1 class Ib gene	H33922_f_at L40362_f_at M10094_g_at M11071_f_at M24026_f_at M24324_f_at M31018_f_at M31038_at rc_AA858651_f_at rc_AA945159_s_at rc_AI103500_f_at rc_AI176358_f_at rc_AI235223_at	3,4* 3,31** 4,42* 1,74* 3,78** 3,13** 3,59** 7,31** 4,05** 8,32 4,09* 4,73* 4,06**	1,51* 2* 2,67* 1,15 2,36* 1,73* 2,2* 2,21* 1,61 7,34* 1,32 2,16* 2,84*	2,2* 2,48* 2,46* 1,39 2,78** 2,33 2,87* 5,44 2,34 4,6 2,63 2,74* 2,34*
MHC class Ib antigen (RT1.Cl)	AF025308_f_at	3,83	1,53	2,75
MHC class I RT1.O type 149 processed pseudogene	L40364_f_at	3,89**	2,31*	2,92*
MHC class Ib RT1.S3	AF029240_at AF029240_g_at rc_AI235890_s_at	4,56* 3,72 3,53*	2,04 2,18 1,83	1,36 1,33 1,39
Rat mRNA for RT1.D beta chain	X53054_at X53054_g_at	17,25** 3,9*	8,7* 3,36*	11,8* 2,9**
MHC class I antigen (RT1.EC2) gene	AF074608mRNA_f_at	3,69**	2,31*	2,82*
MHC class I antigen gene (RT1-u)	M64795_f_at	2,51*	1,02	1,99
Transporter 1, ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP)	X57523_at X57523_g_at	1,75 12,91*	0,81 3,38	1,17 2,96
Transporter 2, ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP)	X63854_at	2,43	1,16	1,27
Alpha-2-macroglobulin	rc_AA900582_at	1,68*	1,11	1,67
Beta-2-microglobulin	rc_AI170268_at	2,79**	2,87**	2,5**
Chromosome 20, major histocompatibility complex	rc_AI235223_at	4,06**	2,84*	2,34*
Butyrophilin-like 2 (MHC class II associated)	K02815_s_at	6,21**	4,16*	4,66*
Rat MHC class II RT1.u-D-alpha chain mRNA, 3' end	M15562_at M15562_g_at	13,48** 12,48**	9,05* 10,37**	9,02** 9,8**
Major histocompatibility complex, class II, DM alpha	Z49761_at U31598_s_at	3,81* 7,42**	1,27 1,94	1,46 2,67
Major histocompatibility complex, class II, DM beta	U31599_at U31599_g_at	21,4* 37,6**	1,94 4,41	6,68 12,13

Ergebnisse

	rc_AI171966_at	38,13*	18,93*	13,49*
CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility class II antigen-associated)	X13044_at	13,53**	10,89**	10,58**
	X13044_g_at	14,75**	13,1**	12,34**
	X14254cds_gt_at	28,01**	17,02**	23,68*
MHC class II Transactivator	rc_AI045321_at	2,52*	1,45	1,29
Rat mRNA for MHC class II antigen RT1.B-1 beta-chain	rc_AI228153_s_at	34,75**	26,32**	15,82
	X56596_at	23,35**	10,83**	11,15**
	M36151cds_s_at	4,34*	1,76	2,9

Tabelle 21: Übersicht über die aufregulierten Gene, die direkt mit der Präsentation von Antigenen korreliert sind. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis zwischen den verschiedenen EAE-Phasen und gesunden, naiven Ratten, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Expression von DC-spezifischen Genen in der EAE

Dendritische Zellen initiieren und unterhalten T-Zell-vermittelte Immunantworten. Die Präsenz von Dendritischen Zellen im immun privilegierten ZNS ist erst in jüngerer Zeit in der PLP induzierten EAE von SJL-Mäusen (Suter et al., 2000), der MBP induzierten EAE der Lewis-Ratte (Matyszak and Perry, 1996) sowie der MOG-Peptid induzierten EAE von C57Bl/6-Mäusen (Serafini et al., 2000) nachgewiesen worden. Aus diesem Grund wurde die Expression von Genen, deren für die Anwesenheit von Dendritischen Zellen im ZNS sprechen, näher untersucht (Tabelle 22).

DC-assoziierte Gene	Sondensatz	akut - gesund	Remission - gesund	relapsierend - gesund
GPNMB	rc_AA851814_at	155,21*	14,85	63,68*
	rc_AA997841_at	104,98*	5,77	49,49*
	rc_AI112012_at	55,31*	14,74*	23,82*
DORA (IgSF6)	AJ223184_at	21,76*	0,33*	2,57
	AJ223184_g_at	10,62*	1,74	1,41
Lysosomal acid lipase A	rc_AA874784_s_at	2,79**	3,39*	2,83
	S81497_i_at	2,94*	1,66	2,08
	S81497_s_at	2,67*	4,32	3,82
Dendritic cell immunoreceptor (DCIR)	rc_AI234694_f_at	9,48	4,07*	3,54
	rc_AI230142_at	34,66*	7,62**	8,29*
Ferritin (light chain)	rc_AI231807_at	1,98*	0,93	1,56
	rc_AI231807_g_at	2,86*	1,61	2,15
CD14	AF087943_s_at	13*	2,18	2,11
CD36	AB005743_at	2,55	0,88	0,98
	AB005743_g_at	5	1,11	1,33
CD11b	U59801_at	4	0,61	2,16

Tabelle 22: Übersicht über die regulierten Transkripte, die mit Dendritischen Zellen assoziiert sind. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis zwischen den verschiedenen EAE-Phasen und gesunden, naiven Ratten, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Es ist offensichtlich, dass die DC-assoziierten Gene äußerst stark während der akuten Phase hochreguliert sind, was dafür spricht, dass sie eine wichtige Rolle bei der lokalen Aktivierung von Effektorzellen haben. Am stärksten dieser Gene waren GPNMB und DORA reguliert.

Ergebnisse

Um die Array-Ergebnisse zu bestätigen, wurden für diese beiden Gene RealTime-PCRs durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 33 zu sehen sind. Im Falle von GPNMB wurden die Array-Ergebnisse sehr gut von der RealTime-PCR bestätigt. Bei DORA traf dies

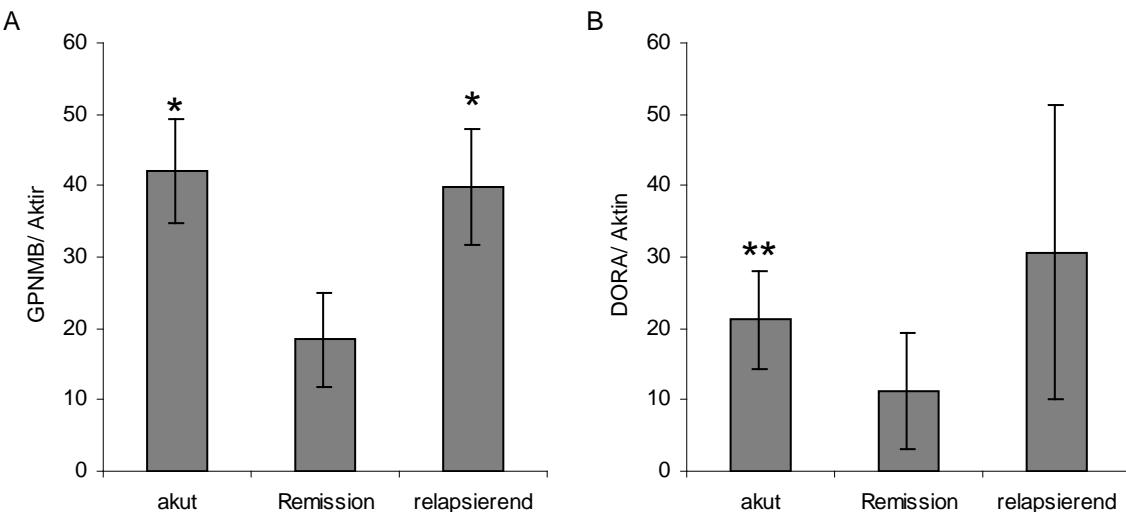


Abbildung 33: Bestätigung der Arrayergebnisse mittels RealTime-PCR für A) GPNMB und B) DORA. Ergebnisse sind jeweils ins Verhältnis zur Expression bei gesunden Tieren gesetzt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

allerdings nur für die akute Phase der EAE zu. Danach unterschieden sich die Ergebnisse aus der RealTime-PCR und der Mikroarray-Studie leicht. Während DORA in den Mikroarrays während der Remission nicht stärker exprimiert zu sein scheint als bei gesunden Tieren, ergab sich bei der RealTime-PCR eine leichte, insignifikante Aufregulation dieses Transkriptes. Ähnlich verhält es sich in der relapsierenden Phase, in der die RealTime-PCR ebenfalls eine höhere Expression von DORA belegt als die Mikroarray-Studie. Die sehr hohe Standardabweichung bei der DORA-Expression in der relapsierenden Phase kann als Beleg für die heterogenen biologischen Prozesse in dieser Phase der EAE gesehen werden.

Gene des TGF β -Signalwegs

TGF β hat unter anderem eine wichtige Funktion bei der Suppression von Immunreaktionen. Die Moleküle, die eine Funktion im TGF β -Signalweg haben sind im Verlauf der EAE kaum reguliert - wie in Tabelle 23 und Abbildung 34 zu sehen ist.

Moleküle des TGF β -Signalwegs	Sondensatz	akut - gesund	Remission - gesund	relapsierend - gesund
Tumor necrosis factor superfamily, member 2 (TNFa)	E02468cds_s_at	1,30	0,92	1,13
Bone morphogenetic Protein 4 (BMP)	rc_AI071861_at	0,66	2,12*	1,73

Ergebnisse

	Z22607_at	0,49	0,46	1,19
Transforming growth factor, beta I	X52498cds_at	4,69	1,54	3,02
Interferon γ	AF010466_s_at	0,76	0,90	0,66
	M29317_at	1,31	0,96	0,99
Epidermal growth factor (EGF)	U04842_at	1,35	0,86	1,00
Nuclear factor κ B p105 subunit	L26267_at	1,26	1,71*	1,31
MAD homolog 1 (Smad1)	rc_AI010195_at	1,26	1,18	1,29
	U66478_at	1,20	0,89	1,14
	AF067727_s_at	0,79	0,66	0,73
MAD homolog 2 (Smad2)	AB017912_at	1,20	0,67	0,92
	AB017912_g_at	1,26	1,09	1,13
	rc_AI105449_at	1,25	1,14	0,96
	rc_AI228675_at	0,99	1,37	1,02
Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)	rc_AA849827_at	0,96	1,96	1,34
	rc_AA849827_g_at	3,99*	2,36*	1,52
	rc_AA892553_at	12,95*	13,37	3,36
	rc_AA899171_at	4,09**	2,45*	1,61
	rc_AI105268_at	3,50*	3,79*	1,50
MAD homolog 7 (Smad7)	AF042499_at	0,76	0,61	0,71
Extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1)	M61177_s_at	0,73	0,75	0,92
	rc_AI235753_at	0,77	0,70	0,64*
Serine (or cysteine) Protease inhibitor, member 1 (PAI-1)	M24067_at	12,96*	1,29	1,40
FK506-binding Protein 1a (FKSP12)	D86641_at	1,43	0,38*	0,89
	rc_AA875594_s_at	1,77*	1,10	1,09
	rc_AI176170_at	1,47	1,04	1,03
	rc_AI178506_at	1,24	0,68	0,78
	rc_AI228738_s_at	2,00*	0,57	0,96
BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMB I)	rc_AI234702_at	0,90	0,79	0,85
MAD homolog 3 (Smad3)	U66479_at	1,07	0,95	1,02
MAD homolog 4 (Smad4)	rc_AI008639_at	1,16	1,36	1,14
MAD homolog 9 (Smad 8)	AF012347_at	1,22	0,99	1,02
Leukemia inhibitory factor (LIF)	AB010275_s_at	0,61	0,88	0,96
Beta-catenin	rc_AA817853_at	1,04	1,02	1,00
	rc_AA819695_at	1,39	1,11	1,28
	rc_AI013204_at	1,56	2,13*	1,73
	rc_AI013676_at	1,68	1,32	1,64
	rc_AI176976_at	1,93*	1,03	1,17
Janus kinase 1 (JAK-1)	AJ000556cds_at	1,11	0,48*	0,81
Stress activated protein kinase α II (JNK2)	rc_AI231354_at	0,85	0,55	0,71
	rc_AI231354_g_at	1,08	2,04**	1,13
	L27112_s_at	0,44	0,29	0,33
Lymphoid enhancer binding factor 1 (TCF1)	rc_AI231086_at	1,38	1,21	1,14
Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)	rc_AI008865_s_at	1,28	1,29	1,25
	rc_AI236828_s_at	1,63*	1,22	1,11
	X91810_at	0,88	1,38	1,04
V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (JUN)	X17163cds_s_at	1,02	1,02	1,31
	rc_AA944014_at	1,78	4,52*	1,55
	rc_AA945867_at	1,57	2,81*	1,60
	rc_AI175959_at	1,63*	1,66*	1,41
Osteopontin	M14656_at	3,49	1,23	1,63
Transforming growth factor, beta receptor 1 (TbR-I)	L26110_at	0,95	2,38	1,63
	A81584_s_at	1,21	0,74	1,27
Transforming growth factor, beta receptor 2 (TbR-II)	L09653_s_at	1,19	0,55*	0,92
	S67770_at	1,40	0,68	1,13
Transforming growth factor, beta receptor 3 (Betaglycan)	M77809_at	1,06	1,25	1,16
	M80784_s_at	0,65	1,16	1,02
Inhibin beta-A (Activin)	M37482_at	1,19	0,87	1,09

Ergebnisse

Latency associate protein (LAP)	rc_AI232078_at rc_AA850753_at	1,44 1,20	1,09 1,31	0,75 1,01
Noggin	rc_AA859752_at U31203_at	0,61 0,72	1,38 0,83	1,68 1,05
Thrombospondin 1	rc_AA964755_at	13,35	0,66	0,98
Thrombospondin 2	rc_AA963477_at	6,96	5,26	2,87
Thrombospondin 4	X89963_at	3,47	2,67	2,08

Tabelle 23: Übersicht über die aufregulierten Gene des TGF β -Signalwegs. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis zwischen den verschiedenen EAE-Phasen und gesunden, naiven Ratten, *: p \leq 0,05, **: p \leq 0,01.

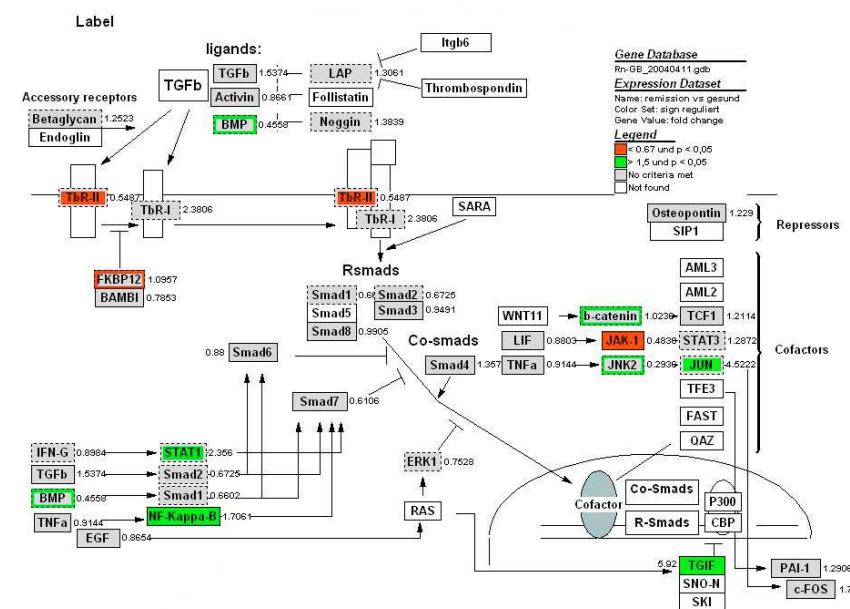
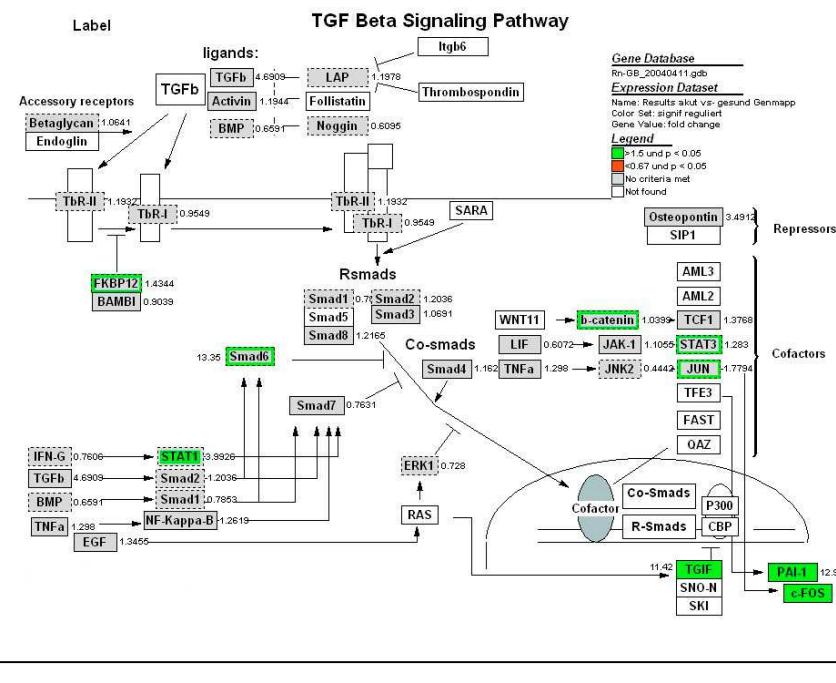
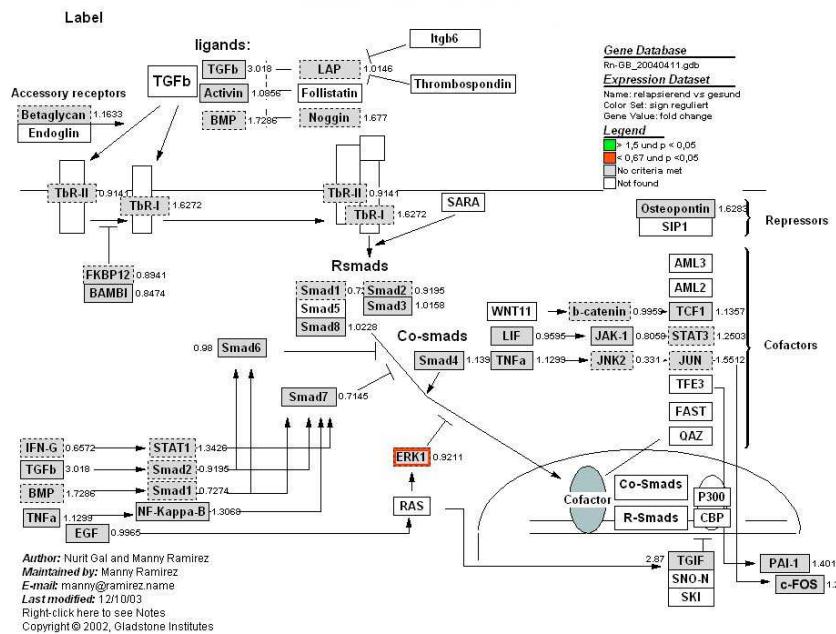


Abbildung 34: Regulation von Genen, die eine Funktion in der Signalgebung von TGF β haben, analysiert mit GenMAPP 2.0 (Gene Micro-Array Pathway Profiler). Weiß markierte Gene bedeuten, dass auf den benutzten DNA-Chips keine entsprechenden Sondensätze für das jeweilige Gen identifiziert werden konnten. Grau unterlegte Gene lassen sich zwar auf den Chips finden, entsprechen aber nicht den angegebenen Kriterien für eine Regulation. Grün unterlegte Gene sind mindestens 1,5fach hochreguliert und mit einem p-Wert von kleiner gleich 0,05 reguliert. Rot unterlegte Gene sind mindestens 1,5fach herunterreguliert und mit einem p-Wert von kleiner gleich 0,05 reguliert. Bei Feldern die rot oder grün umrandet sind, ist ein Teil Sondensätze für das jeweilige Gen entsprechend reguliert. **Seite 91 Mitte)** Vergleich der Expression in der akuten Phase mit gesunden Tieren. **Seite 91 unten)** Vergleich der Expression in der Remission mit gesunden Tieren. **Seite 92)** Vergleich der Expression in der relapsierenden Phase mit gesunden Tieren.

Ergebnisse



Fortsetzung von Abb.34

Die Expression einer Vielzahl von Genen mit sehr unterschiedlichen Funktionen wird durch TGF β reguliert. Um festzustellen, ob in irgendeiner der untersuchten Krankheitsphasen TGF β eine größere Rolle spielt, wurden die Gene, von denen bekannt ist, dass sie durch TGF β induziert oder supprimiert werden, herausgesucht und mit dem Expressionsprofil während dieser Studie verglichen (Tabelle 24).

durch TGF β supprimierte Gene	Sondensatz	akut - gesund	Remission - gesund	relapsierend - gesund
c-Myc‡	Y00396mRNA_g_at	2,57*	1,62	1,24
Cyclin A2 †	rc_AA998516_at	7,61**	1,81	1,21
Cyclin B2 †‡	rc_AI008203_at rc_AA851405_at	1,89 1,08	1,06 1,42*	1,23 1,25
Cyclin D2 ‡	rc_AA899106_at D16308_at	1,38 0,85	0,57 0,54	0,88 0,75
Cyclin-dependent kinase 4 •	rc_AI177843_at L11007_at	1,09 1,77*	0,76 0,62	0,76* 1,22
E2F transcription factor 5 (E2F5) †	U31668_at	1,18	1,36	1,12
Fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 4 (Facl4) ‡	rc_AI236284_s_at rc_AI045002_at rc_AA925424_at D85189_at	1,6* 1,02 1,93 2,20*	0,97 0,76 2,52* 2,24*	0,93 0,88 1,15 1,35
GATA-binding protein 3 †	AB000217mRNA_at rc_AI230345_at	1,28 1,39	0,88 0,85	1,19 1,02
Inhibitor of DNA-binding 2 (Id2) †‡	rc_AI230256_at	2,01	3,09*	1,76
Cadherin 1 †	rc_AA946081_s_at	0,70	0,48	0,44
Phospholipase C-L2 †	rc_AI058656_at	0,96	0,84	1,11

durch TGF β induzierte Gene	Sondensatz	akut - gesund	Remission - gesund	relapsierend - gesund
Actinin, alpha †	rc_AA848941_at rc_AA848941_g_at rc_AA924794_at	1,17 1,85 2,11*	0,65 1,33 1,41	1,25 0,90 1,27
BMP-1 †	rc_AI070868_at	1,18	1,66	1,60*

Ergebnisse

Tyrosine kinase 3 (Bruton's tyrosine kinase) †	rc_AA852055_at D37880_at	1,20 0,31	0,96 0,94	1,07 0,93
Calcyclin binding protein †	rc_AA963714_at	1,03	1,78	1,42
Cell division cycle 25A (cdc25) †	rc_AI059933_at	1,05	1,41	1,25
Colony stimulating factor 1 †	M84361_at	0,92	0,60	0,91
Cyclin D3 †	U49935mRNA_s_at D16309_at D16309_g_at	1,26 1,04 1	0,63 0,53* 0,52	0,91 0,87 1,06
Cyclin dependent kinase inhibitor 2B (p15) ‡	S79760_at rc_AI176486_at	0,88 1,18	0,76 1,03	0,77 1,09
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) ‡	L41275cds_s_at U24174_at	1,26 1,12	1,03 1,23	1,33 1,20
Damage-specific DNA binding protein 1 (Ddb1) †	rc_AI230190_at	1,28	0,67*	0,81
Fibronectin †	rc_AA955600_at M28259cds_at L00191cds#1_s_at	1,42 3,47 8,19*	0,92 0,79 0,60	1 0,96 1,35
GATA-2 †	rc_AA899775_at	1,02	0,94	0,96
Hairy and enhancer of split 1 (Drosophila) (HES1) †	D13417_at D13417_g_at	0,93 1,23	0,79 0,89	0,83 1,04
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (HNRPM) †	U32577_at rc_AA899743_at	1,28 0,81	0,43 0,94	0,92 1,01
Integrin, beta 4 †	U60096_at	1,04	0,76	0,84
Jagged 1 †	rc_AA900503_at L38483_at	2,40 1,90*	1,80 1	1,15 1
Janus kinase 2 †	U13396_at U13996_g_at rc_AI229643_at rc_AI145235_at rc_AI105460_at AJ000557cds_s_at	1,35 1,93* 2,33* 2,31 1,26 1,06	0,59 0,75 2,33* 1,33 1,24 1,23	1,17 1,24 1,42 1,17 1,21 1,19
Junctional adhesion molecule 1 (JAM1) †	rc_AI232375_at	1,50*	0,90	0,94
Karyopherin beta 3 †	rc_AI236903_at rc_AI137586_at rc_AA964226_at	0,93 1,71 2,28	1,20 0,74 0,88	1,12 0,88 1,42
Kinesin light chain 1 †	rc_AI073056_s_at rc_AA899876_at rc_AA899876_g_at rc_AA818427_at M75148_at	0,42** 0,79 1,13 1,24 0,55*	0,23** 1 0,86 1,07 1,15	0,56* 0,89 1,02 1,07 0,87
Laminin alpha †	rc_AA946108_at	1,18	0,98	0,97
MMP12 †	X98517_at	1,27	1	1
Musclebind-like Protein 2 2 (MBLL) †	rc_AI236907_at rc_AI008236_at rc_AA944502_at rc_AA944502_g_at rc_AA892813_s_at rc_AA818999_at	0,71* 0,86 1,37 1,53 1,30 0,81	0,98 1,06 2,12 2,35 2,40 0,30	0,84 0,85 0,95 1,10 1,01 0,47
MyD118 (GADD45b) ‡	rc_AI070068_at	1,79*	1,55	1,63*
Notch 1 (DTX1) †	X57405_at X57405_g_at rc_AI136875_at	0,95 1 1	0,66 1,49 1,30	0,95 1,32 1,06
Phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent) †	U38376_s_at	1,12	0,65	0,98
Protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform †	S78217_s_at	1,32*	1,09	1,17
Protein phosphatase 2A, regulatory subunit B (PR 53) †	rc_AI231775_at	1,03	1,04	1,10
Proviral integration site 1 PIM1 †	X63675_at	1,11	0,79	0,97

Ergebnisse

	rc_AI008309_at rc_AA944209_at	1,67 12,35	1,36 8,68*	1,36* 2,84
RhoB [‡]	rc_AA998352_s_at rc_AA900505_at	0,82 0,98	0,19* 1,24	0,80 1,04
Core binding factor, runt domain, alpha subunit, CBFA2 [‡]	rc_AI045404_at L35271_at	0,51 1,65	0,63 1,23	1,04 0,64
TGFb-inducible early growth response protein 2b	rc_AI043906_at	1,35	0,85	1,22
MAD homolog 6 (Smad6) [‡]	rc_AI175564_at rc_AI136466_at rc_AA997044_at rc_AA963778_at	0,99 0,93 1 3,97	0,78 0,81 0,88 1	1,08 0,97 0,98 2,42
Snail homolog 2 (Slug) [‡]	U97061_at	1	4,26*	2,43
Sry-Box 4 (Sox4) [‡]	rc_AI137787_at rc_AI137765_at	1,04 1,03	0,80 2,67*	1,20 2,48
Suppression of tumorigenicity (Hsp70-interacting Protein) [†]	X82021cds_at rc_AI171166_at rc_AA955104_at	0,93 0,92 0,60	0,40 1,24 1,32	0,79 0,83 1,05
Tenascin c (HXB) [‡]	U09361_s_at U15550_at U09401_s_at	6,11** 2,61 1,66	1,63 0,70 0,94	1,97* 1,07 0,97
Thrombospondin 1 (Thbs1) [‡]	rc_AA964755_at	13,35	0,66	0,98
Transducin-like enhancer of split 3 (TLE3) [‡]	rc_AI171940_at rc_AI043969_at rc_AA963862_at rc_AA943427_at	1,38 1,31 1,42 1,25	0,76 1,06 1,05 1,13	0,93 1,36 1,34 1,10
Transforming growth factor beta stimulated clone 22 (Tgfb14)	L25785_at	0,82	1,17	0,96
Transforming growth factor, beta induced, 68 kDa	rc_AI231127_at	4,38	0,46	0,40
Na ⁺ and H ⁺ -coupled glutamine transporter (Hnrpu) [†]	rc_AI058964_at H32350_s_at D14048_at D14048_g_at	0,77 1,02 0,86 1,45	1,58* 0,51 1 1,68	1,22 0,83 0,92 1,35
c-Fos	rc_AI176185_at	3,49*	1,79	1,24
MAD homolog 7 (Smad 7) [‡]	AF042499_at	0,76	0,61	0,71
Serine (or cysteine) Protease inhibitor, member 1 (PAI-1) [‡]	M24067_at	12,96*	1,29	1,40

Tabelle 24: Übersicht über durch TGF β regulierte Gene (laut Literatur). Dargestellt ist jeweils das Verhältnis zwischen den verschiedenen EAE-Phasen und gesunden, naiven Ratten. Die Gene, die im Rahmen dieser Studie entsprechend der Literaturangaben reguliert sind, wurden grau unterlegt. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, [†] reguliert in Maus-Epithelzelllinie NMuMG (Xie et al., 2003), [‡] humanen Lungen-Epithelzellen (Ewen et al., 1995), [‡] reguliert nach (Miyazawa et al., 2002), [‡] reguliert in HaCaT Keratinozyten (Zavadil et al., 2001).

B-Zellen in der EAE

Obwohl die EAE prinzipiell eine T-Zell-vermittelte Erkrankung ist, spielen abnormale B-Zellantworten eine bedeutende Rolle bei der Induktion der Krankheit und tragen so zur Pathogenese bei (Maglizzi et al., 2004). BAFF ist ein Mitglied der TNF-Superfamilie (TNFSF13B) und fördert die Differenzierung und das Überleben von B-Zellen. CXCL13 ist ein Chemokin, das bei B-Zellen als Attraktant wirkt. Im Verlauf der MOG-induzierten EAE von DA-Ratten ist die mRNA beider Moleküle nach der *Microarray Analysis Software 5.0*

Ergebnisse

(MAS 5.0) von Affymetrix signifikant über den gesamten Verlauf der EAE im Vergleich zu gesunden Tieren aufreguliert. Das für die Ermittlung der Daten für diese Arbeit benutzte Auswerteprogramm *dchip 1.3*, dessen Algorithmus sich von MAS 5.0 unterscheidet, bestätigte diese Aufregulation allerdings nicht. Unter anderem deswegen wurde die mRNA mithilfe einer RealTime-PCR ein weiteres Mal quantifiziert (Abbildung 35). Dabei konnte die Aufregulation beider Moleküle, die sich bei der Analyse mit MAS 5.0 ergeben hat, bestätigt werden, wobei es zwischen der Mikroarray-Expressionsstudie und der RealTime-PCR Unterschiede bezüglich der Höhe der Regulation gab, und die Expression besonders bei CXCL13 in der relapsierenden Phase wiederum sehr heterogen war.

BAFF und CXCL13 tragen auf unterschiedlichen Wegen zu einer Erhöhung der lokalen Präsenz von B-Zellen bei. Aus diesem Grund wurde die Regulation von Genen untersucht, von denen bekannt ist, dass sie spezifisch für B-Zellen sind. Darunter befinden sich hauptsächlich Gene der Immunglobulin-Familie, aber auch einige Oberflächenmoleküle (Tabelle 25).

B-Zell-spezifische Gene	Sondensatz	akut - gesund	Remission - gesund	relapsierend - gesund
Immunoglobulin rearranged kappa-chain variable region, (hybridoma 56R-7), partial cds	L07409_at	0,35	0,71	1,43
Protein Kinase C, beta 1	K03486_s_at	0,49	0,34	0,45*
Immunoglobulin alpha heavy chain (partial), complete constant region	rc_AI234828_g_at rc_AI234828_at	0,53* 1,11	1,33 0,81	1 1,32
Immunoglobulin heavy chain (Loc314512)	M84149_at	0,78	0,82	0,76
Immunoglobulin heavy chain (Loc299446)	L07399_at	0,81	1,3	1,11
Rat Ig active kappa-chain mRNA VJ-region from immunocytoma IR162	M15402_at	0,82	0,93	1
Immunoglobulin rearranged kappa-chain variable region, (hybridoma 56R-9), partial cds	L07400_f_at L07400_i_at M87787_f_at M87787_i_at L07398_at	0,88 1 1 1 1,28	1,07 1 1,2 1 1,01	0,99 1 1,05 1 1,31
Similar to B-cell surface antigen CD20 homolog	rc_AA817742_at	0,88	0,85	1,07
Immunoglobulin rearranged kappa-chain variable region, (hybridoma 56R-3), partial cds	L07408_at	0,89	0,92	0,95
Rat Ig active kappa-chain mRNA VJC-region from immunocytoma IR2	M14434_at	0,9	0,83	0,84
Partial mRNA for immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV gene), clone MZ1801-17	rc_AA893565_at	0,92	1,16	1,1
Immunoglobulin alpha heavy chain (partial), complete constant region	rc_AA955154_at rc_AI169171_at	0,93 1,46*	1,21 0,83	1,39 0,93
mRNA for TPCR04 Protein (B cell surface antigen)	X89694cds_at	0,94	0,85	0,99
Membrano Metallo-endopeptidase	rc_AA817676_at	0,94	0,90	0,80

Ergebnisse

(CD10)	M15944_at rc_AI894298_s_at	1,1 1,11	0,97 1,68*	0,95 1,66
Anti-acetylcholine receptor antibody gene, rearranged Ig gamma-2a chain, VDJC region, complete cds	L22654_at	0,97	0,75	1,19
Clone (RLV086) Ig non-productively rearranged lambda-chain mRNA, V-J region	U75411cds_at	0,97	0,71	0,95
Prohibitin (B-cell receptor associated protein 32 (BAP32))	rc_AI103944_i_at	0,98	1,11	1,25
Immunoglobulin-associated beta (CD79b)	AB004831cds_at	1	1,12	1,19
Immunoglobulin kappa chain variable 28 (V28)	L17078_at L07409_at	1 1,52	1 1,02	1 1,16
mRNA for myeloma immunoglobulin kappa chain	S81289_at	1	1	1
Anti-acetylcholine receptor antibody gene, kappa-chain, VJC region, complete cds	L22655_i_at	1,02	0,99	1,24
B-cell maturation Protein (BCMA)	rc_AI044213_at	1,02	1,08	1,05
B-cell receptor-associated Protein 31 (Loc293852)	rc_AA944335_at	1,02	0,88	1,09
Clone 126.35 immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds	L17077_at	1,08	0,86	1
Immunoglobulin light chain variable region, complementarity-determining regions (hybridoma YTH655)	M87786_at	1,08	0,99	1,11
Ig active lambda2-like chain mRNA, 3'end	rc_AA850138_at	1,08	1,08	1,11
Immunoglobulin binding Protein 1 (CD79a)	rc_AI011179_at	1,08	1,8	1,59
Immunoglobulin rearranged gamma-chain variable region, partial cds (Hybridoma 57R-2)	L07402_f_at L07401_f_at	1,12 1,31	0,88 1,72	1,11 1,77
Pre-B lymphocyte gene 1	Z68145cds_at	1,15	1,15	1,09
Immunoglobulin rearranged gamma-chain variable region, partial cds (Hybridoma 57R-4)	L07407_at	1,19	0,88	1,16
Ig delta heavy chain constant region and 3'ut, immunoglobulin heavy chain variable region	X60290cds_s_at	1,21	0,96	1,07
Similar to anti-idiotype immunoglobulin M heavy chain (Loc299464), mRNA	U75412cds_at	1,21	1,11	1,23
Immunoglobulin kappa-chain constant region, B-cell	M12981_f_at	1,75	1,86	2,96
CD48 (BLAST-1)	X13016_at	1,91*	2,36*	1,7
Syndecan-1 (CD138)	S61865_s_at X60651mRNA_s_at	2,8 4,13*	0,78 1,31	1,25 1,91

Tabelle 25: Übersicht über B-Zell-spezifische Gene in der EAE. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis zwischen den verschiedenen EAE-Phasen und gesunden, naiven Ratten. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Ergebnisse

Das einzige B-Zell-spezifische Gen, das signifikant aufreguliert ist, ist *Syndecan-1*, das in der akuten Phase stärker exprimiert wird als bei gesunden Tieren. Dabei handelt es sich um ein Typ I Transmembran-Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG)-Molekül, das auf der Oberfläche von Prä-B-Zellen sowie Plasmazellen zu finden ist, aber dessen Expression kann auch in Makrophagen induziert werden. Es hat einen negativen Einfluss auf die Migration von Leukozyten (Gotte, 2003).

Ansonsten konnten keine B-Zell-spezifischen Gene gefunden werden, die im Verlauf der EAE innerhalb des ZNS aufreguliert sind. Es war eher festzustellen, dass viele Immunoglobulin Gene durch die EAE herunterreguliert waren, was allerdings methodisch bedingt sein könnte.

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in der EAE

Das in dieser Mikroarray-Studie am stärksten regulierte Gen ist der *Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)*. In der akuten Phase ist die Expression 110-fach höher als bei gesunden Tieren und pendelt sich in den späteren Phasen bei einer 10-fachen Aufregulation ein. SLPI wird von Epithelzellen sowie von Neutrophilen, Mastzellen und Makrophagen synthetisiert. Dieser Inhibitor reguliert die Aktivität von Serin-Proteasen, die bei Entzündungen von großer Bedeutung sind, und hat davon unabhängig weitere Funktionen in der Regulation von Entzündungen, in der Abwehr von Infektionen und in der Regeneration.

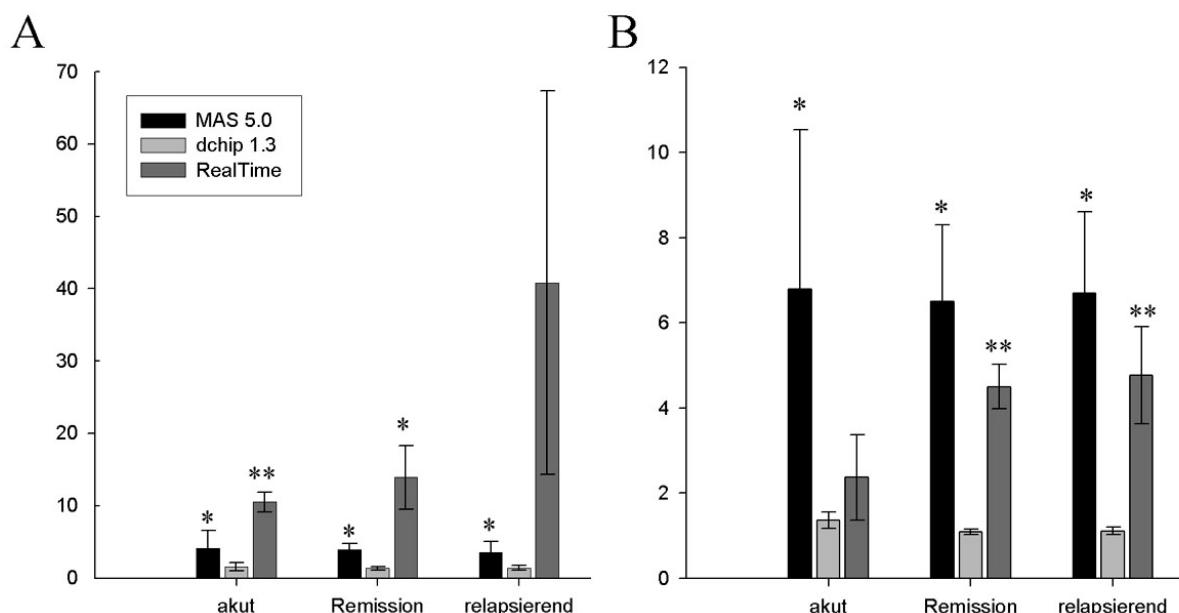


Abbildung 35: Darstellung der Expressionswerte, die mit den angegebenen Methoden gewonnen wurden (bezogen auf gesunde Tiere) **A)** für CXCL13 **B)** für BAFF. *: p < 0,05; **: p < 0,01.

Ergebnisse

Die starke Aufregulation von SLPI in der akuten Phase und die etwas moderatere in der Remission konnten durch eine RealTime-PCR bestätigt werden. Die RealTime-PCR Ergebnisse ergaben allerdings für die relapsierende Phase eine deutlich höhere Aufregulation als die Mikroarray-Ergebnisse (Abbildung 36).

Kinine in der EAE

In Endothelzellen kann die Freisetzung von Stickstoffmonoxid unter anderem durch den Entzündungsmediator Bradykinin induziert werden (Clementi et al., 1999). Bei dem Kinin Bradykinin handelt es sich um ein Nonapeptid, das durch die proteolytische Spaltung der Vorläufermoleküle, den Kininogenen, durch Kallikreine entsteht. Bradykinine bilden das Grundgerüst für die Familie der Kinine, die eine große Palette an pharmakologischen Wirkungen haben; sie gelten unter anderem als Schmerz- und Entzündungsmediatoren. Ihre Wirkung wird dabei hauptsächlich durch zwei Rezeptoren vermittelt – dem B₂-Rezeptor, der konstitutiv in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wie z.B. Endothelzellen, Mikroglia, Astrozyten oder Neuronen, und für die Mehrzahl der akuten Effekte verantwortlich ist (Ding-Zhou et al., 2003), sowie dem induzierbaren B₁-Rezeptor, der präferenziell auf Leukozyten exprimiert wird.

Das T-Kinin (Ile-Ser-Bradykinin) ist ein Ratten spezifisches Protein. Zwei der drei Sondensätzen (vom 3'-Ende (Abb. 37)), die mit seinem Vorläufermolekül dem T-Kininogen korrelieren, sind in der akuten Phase der EAE signifikant aufreguliert (Tabelle 26). Das T-Kinin wird nicht durch Kallikreine, aber durch eine große Anzahl anderer Proteininasen, wie z.B. Trypsin proteolytisch aktiviert (Okamoto and Greenbaum, 1983). Es hat prinzipiell ähnliche Wirkungen wie Bradykinin und bindet an die gleichen Rezeptoren, kann zudem aber, wenn es auf bestimmte Art und Weise gespalten wird, inhibitorisch auf die Cystein-Proteininasen *Papain* und *Cathepsin L* wirken (Moreau et al., 1989).

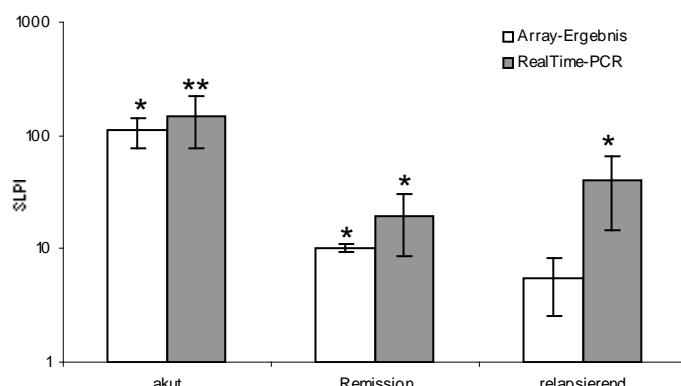


Abbildung 36: Gegenüberstellung der SLPI-Expressionsergebnisse, die mittels Microarray und *dchip 1.3* sowie einer RealTime-PCR erzielt wurden. Alle Expressionswerte stehen im Verhältnis zu der jeweiligen Expression bei gesunden Tieren. Bei der RealTime-PCR sind die SLPI-Expressionswerte jeweils ins Verhältnis zur β Aktin-Expression gesetzt. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$.

Ergebnisse

Andere Moleküle des Kallikrein-Kinin-Systems, für die Sondensätze identifiziert werden konnten, sind im Verlauf der MOG-EAE nicht reguliert. Auch das Gen für *Angiotensin converting enzyme*, ein Enzym, das für den Abbau der Kinine verantwortlich ist, ist nicht reguliert.

Gene	Sondensatz	akut - gesund	Remission – gesund	relapsierend - gesund
T-Kininogen	K02814_at K02814_g_at	2,37* 8,78*	1,19 1,65	1,22 2,99
Kininogen 1	M14369exon#2_at	1	1	1
Kallikrein 1	M26534_f_at M26534_i_at	1,08 1	0,56 1	1,01 1
Kallikrein 3	M30282_at	0,92	0,87	0,96
Kallikrein 6 (Neurosin)	AF016269_at	0,88	1,49	1,19
Kallikrein 7	M22922cds_f_at M19648cds_f_at M19647_f_at M19647_i_at	0,83 1 0,95 1,2	1,1 1,16 0,89 1,04	1,09 1,05 1,25 0,91
Kallikrein 8 (Neuropsin precursor)	AJ005641_at M27217_at	1,01 1,06	1,04 0,90	0,91 0,95
Kallikrein, submaxillary gland S3	M11565_at M11565_f_at	0,97 1,05	0,90 1,4	0,8 1,3
Glandular kallikrein 10 precursor (T-kinino-genase) (K10)	S48142_at	0,75	0,84	0,79*
Bradykinin Receptor B1	AJ132230_at AJ132230_g_at	1 1,07	1,25 1,04	1,06 1,07
Bradykinin Receptor B2	X80187mRNA_s_at	1,22	1,35	1,34
Angiotensin converting enzyme (Kininase II)	rc_AA800722_at L36664_s_at rc_AI009551_at U03734_at	1,05 1,07 1,07 1,12	0,79 0,92 0,98 0,95	0,90 0,98 1,09 1,09

Tabelle 26: Darstellung der Expression von Molekülen, die im Zusammenhang mit der Wirkung von Kininen stehen. Wiedergegeben ist das Verhältnis zwischen den verschiedenen EAE-Phasen und gesunden, naiven Ratten. *: $p \leq 0,05$. Von den Kallikreinen 6 und 8 ist bekannt, dass sie auch im stärkeren Maß im ZNS exprimiert sind – bei den restlichen Kallikreinen ist dies nicht bekannt, aber nicht auszuschließen (Clements et al., 2004).

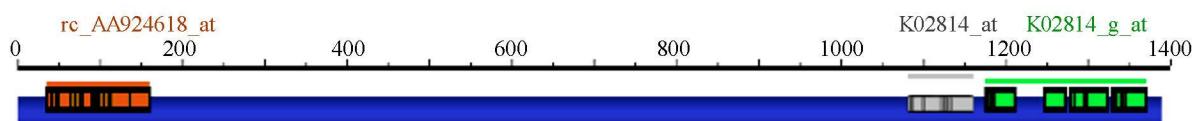


Abbildung 37: Anordnung der zur Detektion des Gens des T-Kininogens dienenden Sondensätze (rc_AA924618_at, K02814_at und K02814_g_at) auf der kodierenden Sequenz des Gens.

Zur Überprüfung der Bedeutung der Kinine für die EAE wurde ein erster Versuch unternommen, in dem der B₂-Rezeptor Inhibitor LF 16-0687 Ms (von Fournier Pharma, Frankreich) in der adoptiven Transfer EAE von SJL/J-Mäusen verabreicht wurde – dieses EAE-Modell wurde ausgewählt, weil es einen synchroneren Krankheitsverlauf garantiert als die aktiv induzierte Krankheit und weil Mäuse bedingt durch ihre im Vergleich zu Ratten

Ergebnisse

niedrigere Körpergröße geringere Mengen des Inhibitors benötigen. Beginnend am Zeitpunkt der Induktion der adoptiven Transfer-EAE, wurde den Mäusen zweimal täglich entweder 5mg LF 16-0687 Ms/kg Körpergewicht, 2,5mg LF 16-0687 Ms/kg Körpergewicht oder isotonische Kochsalzlösung subcutan injiziert. Ab dem zehnten Tag bis einschließlich dem 16. Tag wurden die Tiere nur noch einmal täglich gespritzt. Bis zum Tag 22 nach Induktion der EAE wurden die Tiere täglich untersucht und danach für nachfolgende Gewebeuntersuchungen geopfert und perfundiert. Der EAE-Verlauf der mit LF 16-0687 Ms behandelten Tiere war bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Behandlung beendet werden musste, milder als derjenige der kontrollbehandelten Mäuse. An Tag 15 und 16 war der durchschnittliche klinische Score der Gruppe, die 5mg/kg Körpergewicht des Inhibitors bekamen, signifikant geringer als bei den Kontrolltieren (Tabelle 28 und Abbildung 38A). Wobei der Unterschied zwischen den beiden Gruppen, die unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors bekommen haben, nur sehr klein war. Der Erkrankungsbeginn wurde durch die Gabe des Inhibitors eher nicht verändert.

Die Aktivität des B₂-Rezeptors induziert u.a. die Expression des B₁-Rezeptors, der stark von aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Souza et al., 2004). Die Expression des B₁-Rezeptors in Lymphknoten während der EAE wurde deshalb als Maßgröße für die Wirkung des verwendeten B₂-Inhibitors gesehen und mittels Taqman RealTime-PCR bestimmt. Es ergab sich eine durchschnittliche Verdopplung der B₁-Expression bei den mit NaCl kontrollbehandelten Mäusen am Tag 10 nach Induktion der AT-EAE, die bei den Mäusen nicht auftrat, denen LF 16-0687 Ms ab dem 6. Tag injiziert worden war (Abb. 38B).

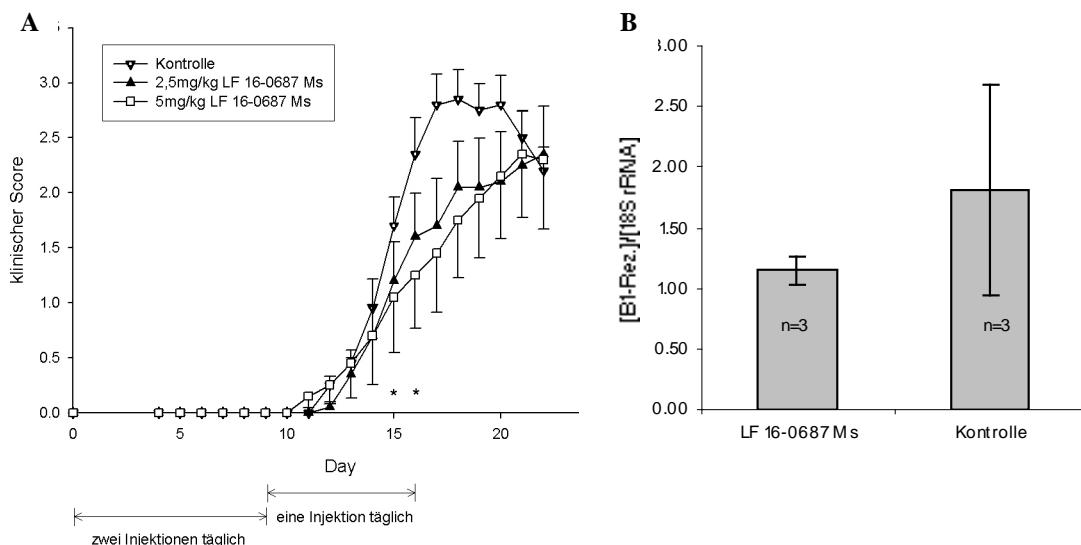


Abb. 38: A) Verlauf der adoptiven Transfer-EAE von weiblichen SJL/J-Mäusen, die mit unterschiedlichen Mengen LF 16-0687 Ms behandelt wurden, \pm Standardfehler, *: $p < 0,05$. B) B1-Rezeptor mRNA in Lymphknoten von SJL/J-Mäusen, die zwischen Tag 6 und 10 täglich mit 5mg/kg LF 16-0687 Ms behandelt wurden. Die Expressionswerte sind jeweils ins Verhältnis zu gesunden Tieren ohne EAE gesetzt worden (\pm Standardabweichung).

	EAE-Inzidenz	Max Score (Durchschnitt ± Standabw.) (d16) (d22)	Durchschnittlicher Beginn der EAE (± Standardabw)	Durchschnittlicher kumulativer Score (± Standardabw) (d16) (d22)
Kontrolle	10/10	2,4±1,1	3,0±0,8	13,0±1,2
2,5mg LF 16-0687 Ms/kg	10/10	1,6±0,2	2,6±1,5	14,8±3,4
5mg LF 16-0687 Ms/kg	10/10	1,3±1,2	2,5±1,5	15,3±3,4

Tabelle 28: Vergleich der klinischen Parameter der AT-EAE von SJL/J-Mäusen, die mit unterschiedlichen Mengen des B₂-Inhibitors LF 16-0687 Ms behandelt wurden.

Der Bradykinin-Rezeptor Inhibitor wurde in einem Proliferationsassay mit PLP aktivierte LNCs von SJL-Mäusen eingesetzt, um auszuschließen, dass er einen direkten Einfluss auf die Proliferation von enzephalitogenen T-Zellen hat (Abb.39). Bis zu einer LF 16-0687 Ms-Konzentration von ~5 μ g/ml war kein Einfluss des Inhibitors auf die Proliferation der LNCs festzustellen. Bei höheren Konzentrationen ergab sich eine Reduktion des Thymidin-Einbaus von bis zu 65% bei ~24 μ g/ml LF 16-0687 Ms. Da derart hohe Konzentration unter physiologischen Bedingungen *in vivo* kaum auftreten, ist davon auszugehen, dass dieser B₂-Rezeptor-Inhibitor auf die Proliferation der enzephalitogenen T-Zellen, die die EAE initiieren, keinen direkten nennenswerten Einfluss haben und nicht toxisch wirkt.

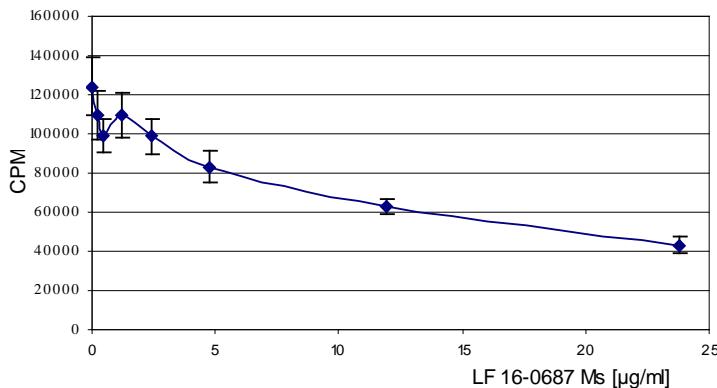


Abb. 39: Proliferationsassay mit aktivierte LNCs von SJL/J-Mäusen und unterschiedlichen Konzentration des B₂-Inhibitors LF 16-0687 Ms. Darstellung des durchschnittlichen Einbau von Tritium-markiertem desoxy-Thymidin von Zwölffach-Ansätzen ± Standardabw.

Kinine binden nicht nur an den B₂-Rezeptor, sondern auch an den B₁-Rezeptor und modulieren dadurch z.B. die Migration von T-Zellen oder die Permeabilität der Bluthirnschranke (Prat et al., 1999). Die Rolle des B₁-Inhibitors wurde mit dem peptidbasierten B₁-Rezeptor-Inhibitor (*Des-Arg⁹,Leu⁸*)-Bradykinin in einem ähnlichen Ansatz untersucht wie zuvor die des B₂-Inhibitors LF 16-0687 Ms. Da (*Des-Arg⁹,Leu⁸*)-Bk relativ instabil ist (biologische Aktivität von ~30min), wurde er allerdings dreimal täglich intraperitoneal appliziert. Das Ergebnis dieses Experiments war eine leichte, aber nicht signifikante Verminderung der klinischen Symptome (Abb. 40).

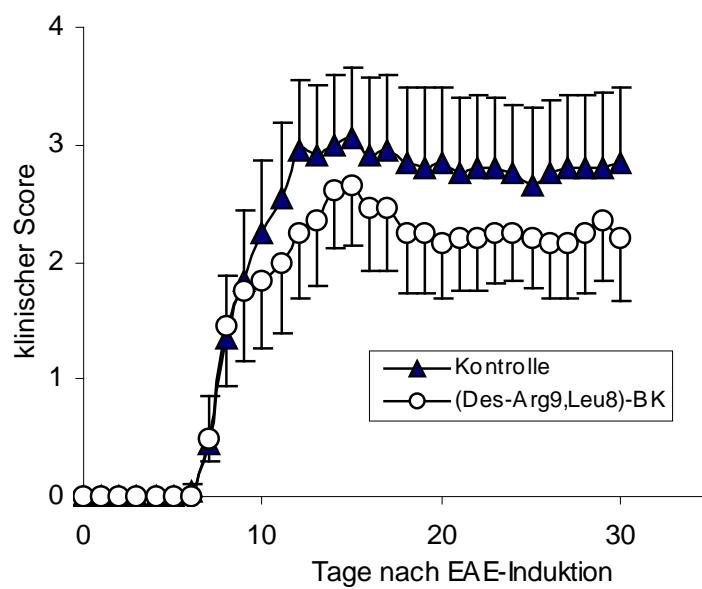


Abbildung 40: Verlauf der adoptiven Transfer-EAE von weiblichen SJL/J-Mäusen, die täglich mit 10mg/kg (Des-Arg⁹,Leu⁸)-Bradykinin behandelt wurden, \pm Standardfehler.

Diskussion

TNF-Familienmitglieder in der EAE

Die Entstehung von Läsionen in Autoimmunkrankheiten ist ein sehr komplexer Prozess, an dem eine Vielzahl von molekularen Interaktionen zwischen vielen verschiedenen Zelltypen beteiligt ist (Hemmer et al., 2003; Steinman et al., 2002). Liganden und Rezeptoren der TNF-Familie sind entscheidend an den Prozessen zur Läsionsentstehung z.B. durch die Aktivierung oder der Unterhaltung von Immunantworten (Korner et al., 1997; Maglione et al., 2004) oder der Einleitung der Apoptose (Taupin et al., 1997) und den daraus sich ergebenden Organschädigungen beteiligt. Andererseits können sie auch zum Zelltod von Immuneffektorzellen und zur Terminierung von Entzündungen beitragen (Wildbaum et al., 2000).

In der vorliegenden Studie wurde die Rolle des Fas-Liganden und TWEAK, zwei Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie, in der MOG-induzierten EAE von DA-Ratten untersucht. Dieses Tiermodell weist viele Eigenschaften auf, die der MS sehr ähnlich sind, wie das Auftreten von Schüben, die Chronizität, die ausgeprägten Demyelinisierungen und den Einfluss sowohl zellulärer als auch humoraler Immunität auf die Krankheitsentstehung (Storch et al., 1998).

Interpretation der Ergebnisse der DNA-Vakzinierung

Im ersten Ansatz zur Untersuchung der Bedeutung von TWEAK und FasL für die EAE wurde versucht, Antikörper für die jeweiligen Proteine mittels DNA-Vakzinierung zu erzeugen, die in der Folge die Funktion des FasL und TWEAK blockieren sollten, um ihre Bedeutung innerhalb der EAE zu bestimmen. Dafür wurden DA-Ratten intramuskulär mit eukaryotischen Expressionsplasmiden vakziniert, die für FasL bzw. TWEAK kodierten.

Dabei ergab sich zwischen den kontrollvakzinierten und den FasL vakzinierten Tieren kein bzw. nur ein geringer, nicht reproduzierbarer Unterschied hinsichtlich des EAE-Verlaufs. Nur die TWEAK-DNA-vakzinierten Ratten zeigten eine deutliche Verstärkung der EAE-Symptome; ein Ergebnis, das sich in vier unabhängigen Experimenten reproduzieren ließ.

Die ursprüngliche Intention des Versuchs, die Blockierung des FasL und TWEAK durch die Induktion von Antikörpern, wurde allerdings nicht erzielt, da gegen keines der beiden TNF-Familienmitglieder Antikörper nachgewiesen werden konnten. Aus diesem Grund wurde

davon ausgegangen, dass die durch die TWEAK DNA-Vakzinierung verursachten Effekte nicht durch die Induktion von Antikörpern vermittelt wurden.

Um überhaupt in der Lage zu sein, die Produktion von Antikörpern zu induzieren, muss das Protein nach der Aufnahme des Plasmids produziert werden. Eine wahrscheinliche Erklärungsmöglichkeit für die beobachteten Effekte der TWEAK DNA-Vakzinierung wäre, dass nach der DNA-Vakzinierung TWEAK-Protein gebildet wurde, das zwar nicht die Bildung von Antikörpern induzierte, aber trotzdem funktionell war und Effekte vermittelte, die für die Verstärkung der EAE-Symptome verantwortlich waren.

Obwohl die Transkription der durch die Plasmide kodierten Gene per RT-PCR bestätigt werden konnte, konnte zumindest kein TWEAK Protein per ELISA oder lokal im WesternBlot nachgewiesen werden. Trotzdem könnte man davon ausgehen, dass TWEAK-Protein gebildet wird. Die Versuche, das Protein nachzuweisen, könnten u.U. deswegen gescheitert sein, weil die TWEAK-Konzentration unterhalb der Nachweigrenze der verwendeten Assays lag. Der Nachweis des TWEAK-Proteins wurde auch in anderen Publikationen als problematisch eingeschätzt (Wiley and Winkles, 2003) und gelang zum Beispiel in den transgenen Mäusen, die TWEAK in der Leber überexprimierten, nur dank eines angehängten Myc-Tags (Desplat-Jego et al., 2002). Astrozyten, die mit TWEAK-pVax1 transfiziert worden waren, sekretierten signifikant mehr CCL2 als mit Kontrollplasmiden transfizierte Astrozyten. Dadurch wurde zumindest belegt, dass das TWEAK-Expressionsplasmid zur Bildung des funktionellen TWEAK-Proteins führen kann.

Ebenso wie die TWEAK DNA-vakzinierter Ratten entwickelten die oben erwähnten transgenen Mäuse, die TWEAK in der Leber überexprimierten, im Vergleich zu Kontrolltieren eine schwerere EAE und hatten lösliches transgenes TWEAK im Blut, obwohl sie das membranständige Gesamtprotein exprimierten (Desplat-Jego et al., 2002). Die TWEAK-Sequenz beinhaltet eine Spaltungsstelle und nur in zwei Studien konnte bisher überhaupt die membranständige Form von TWEAK nachgewiesen werden (Kawakita et al., 2005; Nakayama et al., 2000) – ansonsten wurde nur die lösliche Form des Proteins beobachtet. Nach der DNA-Vakzinierung könnte also die N-terminale Sequenz des TWEAK-Proteins abgespalten worden sein, so dass lösliches TWEAK entstand, das in die Blutbahn freigesetzt wurde und weit entfernt am bzw. innerhalb des ZNS negative Effekte auf den EAE-Verlauf hatte. Dies stellt auch eine weitere Erklärung für die gescheiterten Versuche dar, das Protein mittels WesternBlot nachzuweisen, denn eine Freisetzung des Proteins verringert die lokale Konzentration im Muskel. Deshalb stellt sich die Frage, ob die TWEAK DNA-

Vakzinierung über einen vergleichbaren Mechanismus, nämlich lösliches, zirkulierendes TWEAK zu der Exazerbation der EAE führte.

Unspezifische CpG-Effekte der injizierten DNA als Erklärung für die Verstärkung der Krankheit sind eher zu vernachlässigen, erstens weil die EAE erst sechs bis acht Wochen nach der letzten Vakzinierung induziert wurde und zweitens weil die Krankheitsverstärkung auf Kontrolltiere bezogen ist, die abgesehen von der TWEAK kodierenden Sequenz mit dem identischen DNA-Konstrukt behandelt worden sind.

Die erhöhte Expression von CD3-Protein in Rückenmarkern von TWEAK DNA-vakzinierter Ratten an Tag 10 nach der Induktion der EAE zeigt, dass TWEAK Effekte vermittelt, die eine erhöhte Infiltration von Lymphozyten zur Folge haben.

Um den möglichen systemischen Effekt des löslichen TWEAKs zu untersuchen, wurde mit inguinalen Lymphknoten sechs Wochen nach der zweiten Vakzinierung eine Expressionsstudie durchgeführt. Laut dieser Studie führte die TWEAK DNA-Vakzinierung zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von CXCR4 in den inguinalen Lymphknoten, was durch eine RealTime-PCR bestätigt werden konnte. CXCR4, der Rezeptor für CXCL12 (früher: SDF-1), wird allgemein in Zellen des Immunsystems und im ZNS exprimiert (Zou et al., 1998) und trägt zum Homing von unreifen Lymphozyten (Phillips and Ager, 2002) und von zentralen Memory T-Zellen in die sekundären Lymphorgane bei (Scimone et al., 2004). Neuere Studien in Modellen von Autoimmunkrankheiten belegen zudem, dass CXCR4 und CXCL12 auch zur Akkumulation von Lymphozyten an Orten der Entzündung in der Peripherie beitragen (Balabanian et al., 2003; Nanki et al., 2000).

Aufgrund der durch die DNA-Vakzinierung erhaltenen Daten ist davon auszugehen, dass TWEAK eher keinen Einfluss auf die primäre T-Zellantwort hat, da sich bei einem Proliferationsassay keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ergaben und nicht bekannt ist, dass T-Zellen den TWEAK-Rezeptor Fn14 exprimieren.

Die TWEAK DNA-Vakzinierung hatte dementsprechend wahrscheinlich eine mehr oder weniger starke Produktion von TWEAK-Protein zur Folge, das in die Blutbahn freigesetzt wurde und Effekte auslöste, die im Rahmen der EAE zur Erhöhung der Migration von Leukozyten ins ZNS führten und wahrscheinlich unter anderem dadurch die Krankheit verstärkten. Aufgrund des fehlenden Effekts der FasL DNA-Vakzinierung lag der Fokus der weiteren Arbeit auf TWEAK sowie zusätzlich auf dessen Rezeptor *Fibroblast growth factor-inducible 14* (Fn14) bzw. der Rolle der beiden Moleküle in der EAE.

Interpretation der Ergebnisse der Proteinvakzinierung

Da die DNA-Vakzinierung nicht zu dem gewünschten Ziel der Produktion von Antikörpern führte, wurde mit der Proteinvakzinierung eine andere Methode zur Antikörperinduktion getestet. Die Ratten wurden statt mit dem DNA-Konstrukt zweimal direkt mit rekombinantem TWEAK-Protein (rTWEAKext), dem der membranständige und der intrazelluläre Bestandteil fehlt, bzw. dem rekombinanten Fn14-Protein (rFn14) zusammen mit dem Antikörper induzierenden Adjuvans Aluminiumhydroxid vakziniert. Diese Methode führte reproduzierbar zur Entstehung hoher Antikörpertiter gegen das jeweilige Protein.

Wenn sechs bis acht Wochen nach der letzten Vakzinierung die EAE induziert wurde, entwickelte sich bei den Tieren mit einem anti-TWEAK- bzw. anti-Fn14-Antikörpertiter ein deutlich milderer Krankheitsverlauf als bei den Kontrolltieren. Die protektive Wirkung der Fn14-Vakzinierung wurde mit dem Krankheitsverlauf ausgeprägter und stärker als die der TWEAK-Proteinvakzinierung. In einem zweiten Tiermodell, der PLP-induzierten EAE von SJL/J-Mäusen, das eher ein Modell für eine relapsierende T-Zell-vermittelte Entzündung des ZNS ohne eine wesentliche Beteiligung humoraler Immunität an der Läsionsentstehung darstellt, konnte die protektive Wirkung der TWEAK- und Fn14-Proteinvakzinierungen bestätigt werden.

Die Funktionalität der durch die Proteinvakzinierungen induzierten Antikörper konnte in Folgeexperimenten durch eine Verringerung der TWEAK/Fn14-Signale in einem etablierten endothelialen Zellsystem (Harada et al., 2002) nachgewiesen werden. Isoliertes IgG von den rTWEAKext- oder rFn14-vakzinierten Ratten, aber nicht von den Kontrolltieren supprimierte die TWEAK vermittelte Sekretion des Chemokins CCL2. Daraus ließ sich schließen, dass die durch die Proteinvakzinierung induzierten Antikörper Fn14-vermittelte intrazelluläre Signale verringern.

In einer umfangreichen histopathologischen Studie mit dem Rückenmarksgewebe der proteinvakzinzierten SJL/J-Mäusen konnte eine signifikante Verminderung von inflammatorischen Infiltraten im ZNS der rTWEAKext- und rFn14-vakzinierten Mäusen im Vergleich zu den kontrollvakzinierten Tieren beobachtet werden. Ebenso wie die Ergebnisse der DNA-Vakzinierungsversuche, in denen eine mutmaßliche exogene Expression von TWEAK die CD3-Expression im ZNS zu Beginn der EAE erhöhte, deuten also auch diese Ergebnisse darauf hin, dass TWEAK Effekte vermittelt, die die Infiltration von T-Zellen fördern. Schließlich reduzierte eine durch Antikörper vermittelte Blockade von TWEAK/Fn14 die Anzahl von entzündlichen Infiltraten. Ausgehend von einer exogenen

Expression von TWEAK nach der DNA-Vakzinierung stellt die Induktion von Antikörpern durch die Proteinvakzinierung einen komplementären Ansatz dar, weil die TWEAK vermittelten Signale nicht vermehrt sondern blockiert werden. Die aus der Blockade von TWEAK/Fn14 folgende Reduktion der EAE-Symptome, kann also zusätzlich als ein weiterer Beleg für die über die exogene Expression von TWEAK wirkende TWEAK DNA-Vakzinierung gewertet werden.

Während frühere Studien eine Beteiligung dieser Moleküle an der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten andeuteten, zeigen diese Untersuchungen zum ersten Mal einen protektiven Effekt der Modulation von TWEAK bzw. Fn14 in der EAE.

TWEAK wird im ZNS wahrscheinlich sowohl von infiltrierenden Leukozyten als auch von residenten Mikroglia und Astrozyten produziert (Desplat-Jego et al., 2002; Nakayama et al., 2000). Astrozyten produzieren nach TWEAK-Stimulation IL-6, IL-8 und ICAM-1, d.h. Moleküle, die entweder proinflammatorisch wirken bzw. direkt an der Infiltration von Immunzellen beteiligt sind (Saas et al., 2000). Es war zudem schon bekannt, dass humane Nabelschnurendothelzellen, die auf ihrer Oberfläche Fn14 exprimieren, nach Stimulation mit TWEAK das besonders auf Makrophagen und Lymphozyten wirkende Chemokin CCL2 sezernieren (Harada et al., 2002). In dieser Studie konnte Ähnliches auch für Zellen beobachtet werden, die für die EAE von größerer Relevanz sind. So induzierte die TWEAK-Behandlung von Astrozyten, die CCL2 nicht konstitutiv exprimieren, eine starke CCL2-Ausschüttung. TWEAK steigerte auch signifikant die CCL2-Produktion von Ratten-Gehirn-Endothelzellen, die allerdings schon konstitutiv CCL2 sezernierten. Demzufolge könnte die Regulierung von CCL2 durch die Vakzinierungen mit rTWEAKext und rFn14 auch *in vivo* einen protektiven Mechanismus repräsentieren. Sowohl für CCL2 als auch für dessen Rezeptor CCR2 wurde bereits gezeigt, dass sie entscheidende Funktionen bei der Entstehung der EAE ausüben (Mahad and Ransohoff, 2003) – die Expression von CCL2 steigt zu einem späten Zeitpunkt der akuten Erkrankung stark an und korreliert generell mit dem Ausmaß der Entzündung (Kennedy et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass das Eindringen von Leukozyten in das ZNS eine Vorbedingung für die CCL2-Produktion von Astrozyten *in situ* ist. Daher wird CCL2 eher eine amplifizierende als eine initiierende Rolle bei der Läsionsentstehung zugeschrieben (Glabinski et al., 1995; Hulkower et al., 1993; Kennedy et al., 1998). Die Gabe von antagonistischen CCL2-Antikörpern und eine DNA-Vakzinierung, die CCL2-Antikörper induzierte, vermittelten folgerichtig einen Schutz vor EAE (Kennedy et al., 1998; Youssef et al., 1999). Außerdem sind CCL2- bzw. CCR2-defiziente Mäuse resistent gegenüber der Entwicklung der MOG-Peptid-induzierten EAE (Fife et al., 2000; Izikson et al., 2000). Ein

kürzlich entdeckter, zweiter Rezeptor von CCL2 ist ebenso auf infiltrierenden Makrophagen und ansässigen Mikroglia zu Beginn der EAE exprimiert (Brouwer et al., 2004).

Aufgrund dieser Daten scheint es möglich, dass TWEAK die Produktion von CCL2 sowohl an den Endothelzellen der Bluthirnschranke als auch an den anliegenden Astrozyten reguliert und dies zumindest für einen Teil der protektiven Wirkung der rTWEAKext- und rFn14-Vakzinierung verantwortlich ist. Die Beobachtungen, dass die Vakzinierung keinen Effekt auf den Krankheitsbeginn hatte und dass die rFn14-Vakzinierung einen im Krankheitsverlauf immer deutlicheren Effekt vermittelte, können durch dieses Modell erklärt werden.

Eine alternative Erklärung wäre es, dass die TWEAK- und Fn14-spezifischen Antikörper die Produktion proinflammatorischer Moleküle durch Fn14 exprimierende Astrozyten inhibieren - zum Beispiel von IL-6, IL-8, ICAM-1 oder Matrix-Metalloproteinasen, deren Expression in der Nähe der Bluthirnschranke die Infiltration des ZNS durch Leukozyten fördert (Wiley and Winkles, 2003).

Für das TNFSF-Mitglied Trail wurde nachgewiesen, dass es zwar nicht toxisch für T-Zellen ist, aber deren Aktivierung verhindern kann (Hilliard et al., 2001; Lunemann et al., 2002). Im Fall von TWEAK ist ein direkter Effekt der Vakzinierungen auf T-Zellen eher unwahrscheinlich. In Bindungsstudien konnte zwar eine Interaktion von TWEAK mit Subpopulationen von B-Zellen und Makrophagen, nicht aber mit T-Zellen beobachtet werden (Kaptein et al., 2000). Darüber hinaus konnte kein zytotoxischer Effekt von TWEAK gegenüber irgendeiner lymphoiden Zelllinie beobachtet werden (Chicheportiche et al., 1997).

Schließlich könnten die induzierten TWEAK- bzw. Fn14-Antikörper auch einen neuroprotektiven Charakter haben. Lösliches TWEAK induziert in kortikalen neuronalen Zellen Apoptose über Fn14. In einem Maus-Ischämiemodell verringerte die Gabe eines TWEAK-Antikörpers das Infarktvolumen signifikant (Potrovita et al., 2004).

Es ist unklar, warum der protektive Effekt der rFn14-Proteinvakzinierung deutlich ausgeprägter ist als der der Vakzinierung gegen TWEAK. TWEAK-IgG und Fn14-IgG hatten *in vitro* eine vergleichbare neutralisierende Kapazität auf die TWEAK-vermittelte Sekretion von CCL2. Möglicherweise werden über einen postulierten, aber bisher nicht nachgewiesenen zweiten TWEAK-Rezeptor zusätzlich Signale vermittelt, die einen hemmenden Einfluss auf die Entstehung der Entzündung im Rahmen der EAE haben (Polek et al., 2003).

Die mRNA, die für TWEAK kodiert, konnte in einer Vielzahl von verschiedenen Geweben identifiziert werden, aber das entsprechende Protein ist nur schwer zu detektieren und konnte bislang nur auf der Zelloberfläche von mit IFN γ aktivierten Monozyten gefunden werden (Nakayama et al., 2000). Es scheint, dass TWEAK hauptsächlich in seiner prozessierten,

löslichen Form vorkommt. Allerdings wäre es durchaus möglich, dass TWEAK nach Kontakt mit seinem Rezeptor zusammen mit diesem internalisiert wird und deshalb nicht auf der Oberfläche von Zellen zu finden ist. Dieser Mechanismus wurde für das TNFSF-Mitglied LIGHT beschrieben (Morel et al., 2000). Falls dies zuträfe, wäre Fn14 auf den Zellen zugänglicher für die neutralisierenden Antikörper als TWEAK, was eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte der rTWEAKext- und rFn14-Vakzinierungen darstellt.

Noch ist nicht geklärt, wo die Wirkung von TWEAK im Rahmen der EAE zu tragen kommt. Die adoptive Transfer-EAE von SJL-Mäusen bietet allerdings die Möglichkeit, den Wirkungsort von TWEAK etwas einzuschränken. In diesem Modell kann man den Einfluss der Proteinvakzinierung auf die Enzephalitogenität von T-Zellen getrennt vom möglichen Einfluss auf z.B. die ZNS-residenten Zellen untersuchen, indem entweder die Spender-Tiere oder die Empfänger-Tiere vakziniert werden. Bei einem ersten Versuch, in dem die Spender-Tiere mit rTWEAKext vakziniert worden waren – also die EAE mit T-Zellen induziert worden war, die entweder aus rTWEAKext vakzinierter oder kontrollvakzinierter Tieren stammten – ergab sich kein Unterschied hinsichtlich des Krankheitsverlaufs. Daraus lässt sich folgern, dass TWEAK wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Entwicklung von enzephalitogenen T-Zellen hat. Dies passt zu den bisherigen Daten in der Literatur, nach denen der Rezeptor Fn14 auf T-Zellen bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend konnte durch Vakzinierungen gegen TWEAK und Fn14 die Bildung spezifischer, neutralisierender Antikörper induziert werden. Diese Antikörper wirkten in zwei verschiedenen Tiermodellen der Multiplen Sklerose protektiv bzw. inhibierend auf den klinischen Verlauf und der Bildung von inflammatorischen Infiltraten im ZNS. Die Blockierung der Wechselwirkung von TWEAK mit seinem Rezeptor Fn14 stellt daher einen neuen Ansatz zur therapeutischen Modulation von ZNS-Autoimmunprozessen und möglicherweise von antigenspezifischen Autoimmunerkrankungen generell dar.

Um definitiv zu beweisen, dass die durch die Proteinvakzinierung induzierten Antikörper tatsächlich verantwortlich für die protektive Wirkung *in vivo* sind, sollten aus proteinvakzinierter Ratten Antikörper isoliert und nach EAE-Induktion zur Therapie ansonsten unbehandelter Tiere verwendet werden. Dieses Experiment steht noch aus, da es außerordentlich viele Ressourcen und Zeit verbraucht.

Der zelluläre Wirkort der TWEAK/Fn14-Vakzinierung ist derzeit noch unklar. Nach den vorliegenden Befunden dürften insbesondere Astrozyten und Endothelien eine wichtige Rolle spielen. Um neben den bereits bekannten Effekten von TWEAK auf diese Zellpopulationen,

der Aufregulation von IL-6, IL-8, ICAM-1 und CCL2, noch weitere möglicherweise beteiligte Effekte nachzuweisen, wäre eine Array-Analyse von Astrozyten, Endothelien oder auch anderen Zelltypen nach Inkubation mit TWEAK-Protein sehr hilfreich.

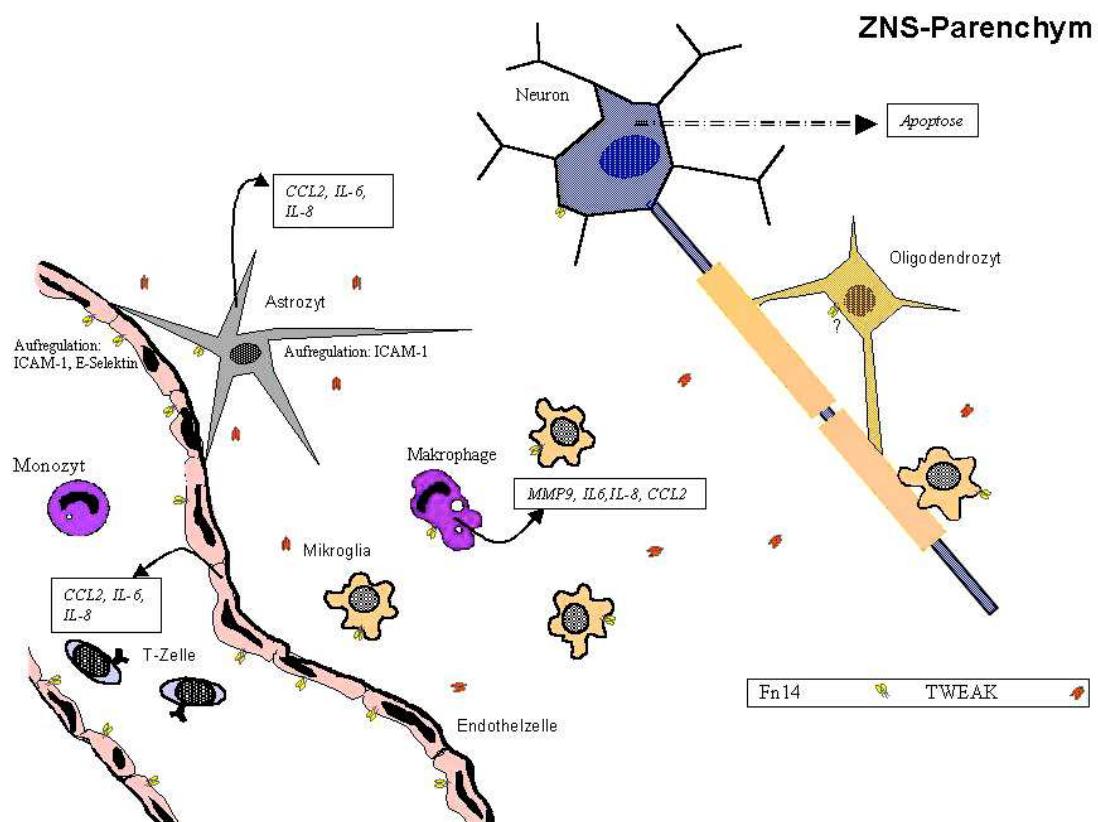
Abbildung 41: Schema der hypothetischen TWEAK-Wirkung auf die EAE

Die Astrozyten, Mikrogliazellen, Neuronen und Endothelzellen exprimieren den TWEAK-Rezeptor Fn14. Ein basales, relativ niedriges Niveau von TWEAK wird wahrscheinlich durch dessen konstitutive Expression in den Astrozyten gewährleistet. Über die Expression von Fn14 auf Oligodendrozyten gibt es noch keine Daten.

Während der EAE kommt es zu einer verstärkten Expression von löslichem, aber wohl auch membrangebundenem TWEAK im ZNS, besonders durch eindringende Monzyten bzw. Makrophagen. Dies führt zu einer Induktion der Produktion von CCL2, IL-6 und IL-8 durch Endothelzellen, Astrozyten und Makrophagen. Besonders CCL2, aber auch IL-8 ziehen eine vermehrte Infiltration von Leukozyten ins ZNS nach sich. Matrix-Metalloproteininasen beeinträchtigen u.a. die Integrität der Bluthirnschranke und ergänzen demzufolge die Funktionen der induzierten Zytoskeletten und Chemokine.

Zudem wird das Adhäsionsmolekül ICAM-1 auf Astrozyten und Endothelzellen durch TWEAK aufreguliert sowie E-Selektin auf Endothelzellen. Beide Moleküle sind an der Zell-Zelladhäsion zwischen Leukozyten und Zellen der Bluthirnschranke beteiligt, die dem Passieren der Bluthirnschranke vorangeht. Ihre Aufregulation ist also ein weiterer Faktor, der durch TWEAK stimuliert wird und die Akkumulation von Leukozyten im ZNS verstärkt.

Fn14 wird auf Neuronen während Stresssituationen aufreguliert und könnte dort nach einer Stimulation durch TWEAK Zelltod vermitteln.



Expressionsprofile der MOG-induzierten EAE der DA-Ratte

Als zweiter Hauptteil der Doktorarbeit wurde eine umfangreiche Expressionsstudie durchgeführt, bei der die Veränderungen, die sich durch die MOG induzierte EAE im ZNS der DA-Ratten ergaben, untersucht werden sollte. Über einen Zeitraum von ungefähr vier Wochen nach Induktion der Krankheit wurden dabei die Expressionsunterschiede auf RNA-Ebene verfolgt. In diesen Zeitraum fielen die akute Phase der EAE, die erste Remission im Anschluss darauf sowie der erste Rückfall, der die Chronifizierung der Krankheit einleitet. Drei gesunden Ratten sowie jeweils drei Ratten, deren Krankheitsverlauf einer der oben genannten Gruppen entsprach, sollten für diese Expressionsstudie verwendet werden.

Dank der *high-density* Arrays der Firma Affymetrix war es möglich, die Expression von ungefähr 25000 Genen parallel zu untersuchen. Das Ziel, das dieser Studie gesetzt wurde, war es, molekulare Zusammenhänge, die eine Rolle in der EAE spielen, aufzudecken sowie eventuell neue Therapiekonzepte anhand der Expressionsveränderungen zu identifizieren.

Einordnung dieser Studie in bereits publizierte, ähnliche Expressionsstudien

Ähnliche Rückenmark-Expressionsstudien mittels der Microarray-Technologie wurden bereits in anderen EAE-Modellen, wie der akuten, MBP-induzierten EAE von Lewis Ratten (Chabas et al., 2001; Nicot et al., 2003), der MOG-Peptid induzierten EAE bei C57Bl/6-Mäusen (Carmody et al., 2002; Ibrahim et al., 2001; Xu et al., 2003), der AT-EAE in C57Bl/6-Mäusen (Whitney et al., 2001) und der spontanen EAE von MBP-T-Zellrezeptor-transgenen T/R- Mäusen (Matejuk et al., 2003) durchgeführt. Zudem wurden in mehreren Studien die Expressionsmuster von Läsionen aus dem ZNS von MS-Patienten mit denen von gesundem Gewebe verglichen (Graumann et al., 2003; Lock et al., 2002; Tajouri et al., 2003; Whitney et al., 2001). Abgesehen von der Studie von Carmody et al., wurde in den EAE-Studien bislang nur ein Zeitpunkt der EAE, nämlich die akute Phase analysiert. Carmody nutzte zusätzlich noch Rückenmark-Gewebe aus Tieren, die sich in der Remission befanden, für seine Expressionsstudie. Dementsprechend hebt sich diese Studie durch ihren Umfang von den erwähnten bereits publizierten ab. Die MOG induzierte EAE in DA-Ratten zeichnet sich durch Entzündungsvorgänge, axonale Schädigungen und ausgeprägten Demyelinisierungen aus und unterscheidet sich zudem von den anderen bereits untersuchten Modellen dadurch, dass in ihr ebenso wie bei einem Großteil der MS-Fälle sowohl Zell- als auch Antikörper

vermittelte Schäden auftreten und dadurch auch die Typ II Läsionen der MS nachgebildet werden (Storch et al., 1998).

Der größte Teil der regulierten Gene aus den bereits erschienenen Publikationen ist ebenfalls in dieser Studie mit DA-Ratten reguliert. 288 Transkripte, für die es auf den hier verwendeten Ratten-Chips entsprechende Sonden gab, wurden in einer oder mehreren der verschiedenen oben zitierten Studien differenziell während der EAE exprimiert – 218 dieser Transkripte wurden in der vorliegenden Untersuchung zumindest während einer Phase im Vergleich zu gesunden Tieren ebenfalls als reguliert identifiziert. In den verschiedenen MS-Studien wurden 526 regulierte Transkripte gefunden – 50% davon wurden auch in dieser als reguliert gefunden. Die für eine Regulation angelegten Kriterien waren eine Veränderung des Expressionsniveaus um den Faktor zwei sowie eine Wahrscheinlichkeit von weniger als 5% für die Nullhypothese – dies entspricht einer gängigen Vorgehensweise in den erwähnten Publikationen.

Diese Übereinstimmungen in der Regulation vieler Transkripte im Vergleich zu anderen Tiermodellen kann als Bestätigung für die Validität der vorliegenden Daten gesehen werden. Die bestehenden Unterschiede zeigen jedoch, dass sich die unterschiedlichen Tiermodelle in wichtigen Aspekten voneinander unterscheiden.

Untersuchung der ausschließlich im ZNS exprimierten Gene

Um die Gene zu finden, die spezifisch nur im ZNS exprimiert wurden, wurden die in den Lymphknoten exprimierten Gene aus dem ersten Teil dieser Doktorarbeit aus der Gesamtzahl der Gene herausgefiltert, die während der EAE im Rückenmark als reguliert identifiziert worden waren. Die Übriggebliebenen wurden als die Gene definiert, die nicht von den infiltrierenden Zellen stammen, also in diesem Fall in ZNS-residenten Zellen exprimiert sind.

Ein ähnlicher Ansatz wurde bereits in der MOG-Peptid-induzierten EAE bei C57Bl/6-Mäusen ebenfalls unter Verwendung von high-density Affymetrix-Arrays verfolgt (Carmody et al., 2002). Auch dort wurden die Gene, die in Lymphknotengewebe exprimiert waren, von denjenigen abgezogen, die es im ZNS waren, um die ZNS-spezifischen Transkripte zu erhalten. Allerdings wurden in der Studie die Expressionsunterschiede nur während der akuten Phase und der Remission jeweils im Vergleich zu gesunden Mäusen analysiert.

Dabei ergab sich ein bemerkenswerter Unterschied zu der vorliegenden Studie. Während in Letzterer fast alle regulierten, nicht in den Lymphknoten exprimierten Gene in der akuten Phase stark herunterreguliert sind, sind bei der Studie mit C57Bl/6-Mäusen einige Gene

aufreguliert. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass dort keine Gene reguliert zu sein scheinen, die im Zusammenhang mit Neurotransmittern stehen, während der vorliegenden Studie eine große Zahl von den entsprechenden Molekülen in der akuten Phase stark herunterreguliert ist.

Oligodendrozyten-spezifische Gene

Die Expression von Genen, die spezifisch für Oligodendrozyten sind, wurde über den gesamten untersuchten Verlauf der EAE als herunterreguliert gewertet, wobei sie in der Remission und der relapsierenden Phase generell wieder leicht ansteigt (Übersicht Abb. 42).

Durch eine RealTime-PCR konnte für MOG die Regulation bestätigt werden – mit der Einschränkung, dass sich bei der RealTime-PCR das Ausmaß der Expression der MOG-mRNA schon in der Remission wieder dem Normalzustand annäherte und nicht erst danach.

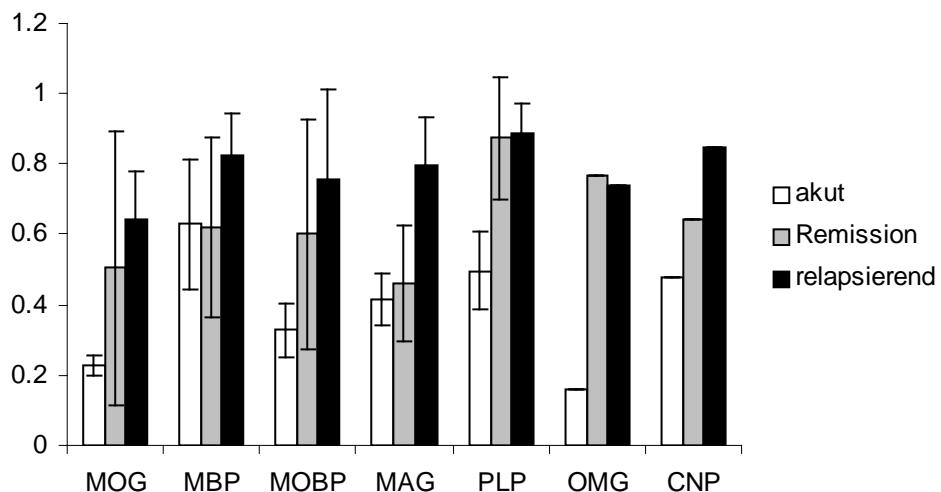


Abbildung 42: Zusammenfassung der Array-Ergebnisse der Oligodendrozyten spezifischen Gene. Dargestellt ist jeweils die Expression in der jeweiligen EAE-Phase im Verhältnis zu derjenigen der gesunden Tiere \pm Standardabweichung. Die Standardabweichungen ergaben sich, wenn mehrere Sondensätze mit einem Gen korrelierten.

Der zeitliche Verlauf der MOG-Proteinmenge im ZNS verhielt sich laut einem WesternBlot zeitversetzt zu dem der mRNA. In der akuten Phase und der Remission ist die MOG-Proteinmenge im ZNS bei ca. 70% der einer gesunden Ratte. In der relapsierende Phase fällt sie dann auf ca. 40% ab – wobei einschränkend zu erwähnen ist, dass hier nur von jeweils zwei Tieren die MOG-Proteinkonzentration bestimmt wurde und die Standardabweichung dabei in der chronischen Phase sehr groß war.

Besonders die Gene für die *Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 (CNP)* sowie für MBP werden als spezifische Marker für myelinisierende Oligodendrozyten angesehen (Di Bello et al., 1999). Deshalb erscheint es wahrscheinlich, dass die Regulation dieser beiden Gene auch Auswirkungen auf die Myelinisierung der Axone hat.

Sowohl Schädigungen als auch der Zelltod von Oligodendrozyten konnten in unterschiedlichem Ausmaß bei MS Patienten nachgewiesen werden (Hisahara et al., 2003). Allerdings scheint der Untergang von Oligodendrozyten in der MS hauptsächlich auf Läsionen der Typen III und IV beschränkt zu sein, die beide bisher kaum durch Tiermodelle reproduziert werden können (Kornek and Lassmann, 2003) und dementsprechend auch nicht in der MOG induzierten EAE von DA-Ratten vorkommen. In der EAE ist bisher bekannt, dass der Zelltod von Oligodendrozyten vorkommt und dass er zur Pathogenese beiträgt (Hisahara et al., 2003). Speziell bei DA-Ratten konnte in den demyelinisierten Läsionen im ZNS ein Verlust von Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Reynolds et al., 2002). Über das Ausmaß und den Zeitpunkt des Zelltods der Oligodendrozyten in der EAE gibt es bislang allerdings kaum Erkenntnisse.

Die Verringerung der Oligodendrozyten spezifischen Gene in dieser Studie deutet entweder eine Schädigung der Oligodendrozyten in der akuten Phase oder deren Zelltod an. Dementsprechend könnte die Expressionsverstärkung dieser Gene im späteren Verlauf der Erkrankung ein Kennzeichen für die Regeneration der geschädigten Zellen, für die Zunahme der Zahl der Oligodendrozyten sein bzw der Reifung von oligodendroglialen Vorläuferzellen sein.

Bei DA-Ratten kommt während der Remission und auch in späteren Stadien zu einer starken Remyelinisierung, und in den demyelinisierten Läsionen sind Anhäufungen von NG₂ Chondroitin Sulfatproteoglykan exprimierenden oligodendroglialen Vorläuferzellen (OPCs) zu beobachten, die sich zu myelinisierenden Oligodendrozyten entwickeln können (Reynolds et al., 2002). Bei NG₂ (chondroitin sulphate proteoglycan) handelt es sich um einen Marker für oligodendrogliale Vorläuferzellen (Dawson et al., 2003). Die Präsenz von OPCs weist wiederum auf den Untergang von Oligodendrozyten hin, denn wenn keine zugrunde gingen, gäbe es keinen Bedarf für die Rekrutierung von OPCs. Aus diesem Grund ist es logisch, dass die Zunahme der Expression der Oligodendrozyten spezifischen Gene während der Remission und der relapsierenden Phase die Vermehrung der Zahl der myelinisierenden Oligodendrozyten widerspiegelt und dass im Umkehrschluss die Abnahme der Expression während der akuten Phase korreliert mit dem Untergang der Oligodendrozyten ist.

Außer der Tatsache, dass die Expression von Genen, die spezifisch für reife Oligodendrozyten sind, im Verlauf der EAE abnimmt und einer wahrscheinlich damit einhergehenden Verminderung der Anzahl von reifen Oligodendrozyten, bieten die Expressionsdaten leider keinen Hinweis auf die Vorgänge, die die Remyelinisierung der Axone betreffen. Zwei Marker für oligodendrogliale Vorläuferzellen (Chondroitin sulfate proteoglycan NG2 (NG2) und Platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α) (Di Bello et al., 1999; Redwine and Armstrong, 1998)) sind über den gesamten EAE-Verlauf nicht reguliert. Dies sagt allerdings kaum etwas darüber aus, ob Vorläuferzellen zu den Läsionen wandern und dort ausdifferenzieren oder nicht. Dafür müsste man eine entsprechende Analyse ausschließlich mit Läsionsgewebe durchführen.

Ein anderes Tiermodell, die MOG-Peptid induzierte EAE von C57Bl/6 Mäusen, wurde bisher in zwei ähnlichen Studien untersucht. Dabei ergab sich im Unterschied zu dieser Studie nur eine leichte Abnahme der Expression von MBP, PLP, MOBP, MAG und MOG in der akuten Phase, die sich für MOG und auch für PLP in der Folge noch verstärkte, während die von MBP, MOBP und MAG wieder leicht anstieg. (Carmody et al., 2002; Ibrahim et al., 2001). In der Studie von *Ibrahim* war dabei die Abnahme der Expression von PLP deutlich stärker als in der Studie von *Carmody*, wobei zu erwähnen ist, dass *Ibrahim et al.* das MOG-Peptid 35-55 zur Induktion der EAE nutzen, während in der anderen Studie das MOG-Peptid 38-50 verwendet wurde, das eine EAE auslöst, die sich aber kaum von denjenigen unterscheidet, die mit dem MOG-Peptid 35-55 induziert wird (Petersen et al., 2004).

Die ausbleibende Erholung der Expression von einigen der myelinspezifischen Genen in der EAE von C57Bl/6-Mäusen lässt vermuten, dass in dem Modell andere Mechanismen zur Erholung beitragen als in der MOG-Protein induzierten EAE von DA-Ratten.

Cholesterin-Metabolismus in der MOG-induzierten EAE

Cholesterin ist auch im ZNS, wo es sowohl von Gliazellen als auch von Neuronen produziert wird, von großer Bedeutung. Es ist ein wichtiger Bestandteil der Zellmembranen und besonders des Myelin, in dem sich ca. 70-80% des im ZNS vorliegenden Cholesterins befinden (Muse et al., 2001). Obwohl Cholesterin zum größten Teil in der Leber produziert wird, wird dasjenige, das im ZNS ein Baustein vom Myelin und Plasmamembranen ist, prinzipiell von ZNS-stämmigen neuronalen und glialen Zellen produziert (Dietschy and Turley, 2004). Astrozyten und Mikroglia produzieren Cholesterin im Überschuss und sekretieren es, komplexiert mit Apolipoprotein E (Mauch et al., 2001). Von den Neuronen

kann es dann über verschiedene Rezeptoren, wie z.B. dem *LDL-receptor* (LDL-R) oder dem *LDL receptor-related protein* (LRP) aufgenommen werden (Bjorkhem and Meaney, 2004). Dieser Cholesterin-Shuttle ist für das Wachstum von Neuronen und die effektive Synaptogenese notwendig (Goritz et al., 2002).

In dieser Studie sind die meisten Cholesterin-Synthese Gene – inklusive der HMG-CoA-Reduktase dem Schlüsselenzym der Cholesterin-Biosynthese – über den gesamten Verlauf der EAE herunterreguliert (Ab. 43). Abgesehen von der Suppression der HMG-CoA Reduktase und der Squalen Epoxidase in jeweils drei von vier MS-Patienten innerhalb von akuten Läsionen im Vergleich zu Gewebe von Patienten ohne Krankheit des ZNS (Lock et al., 2002), wurden bisher weder für die MS noch für die EAE Daten über die Expression dieser Gengruppe publiziert.

Die Synthese von Cholesterin wird weitestgehend durch die HMG-CoA Reduktase reguliert, deren Aktivität stringent reguliert wird: Die Transkription des Gens für die HMG-CoA Reduktase wird durch das *sterol regulatory Element (SRE)* in der Gegenwart von Sterol-Cholesterin-Derivaten inhibiert. Dessen Translation wird durch verschiedene andere Derivate von Mevalonat inhibiert. Zudem führt eine hohe intrazelluläre Konzentration von Cholesterin oder Mevalonat durch Ubiquitinierung zu einem verstärktem Abbau der HMG-CoA Reduktase. Als letzter Regulationsmechanismus kann die HMG-CoA Reduktase durch

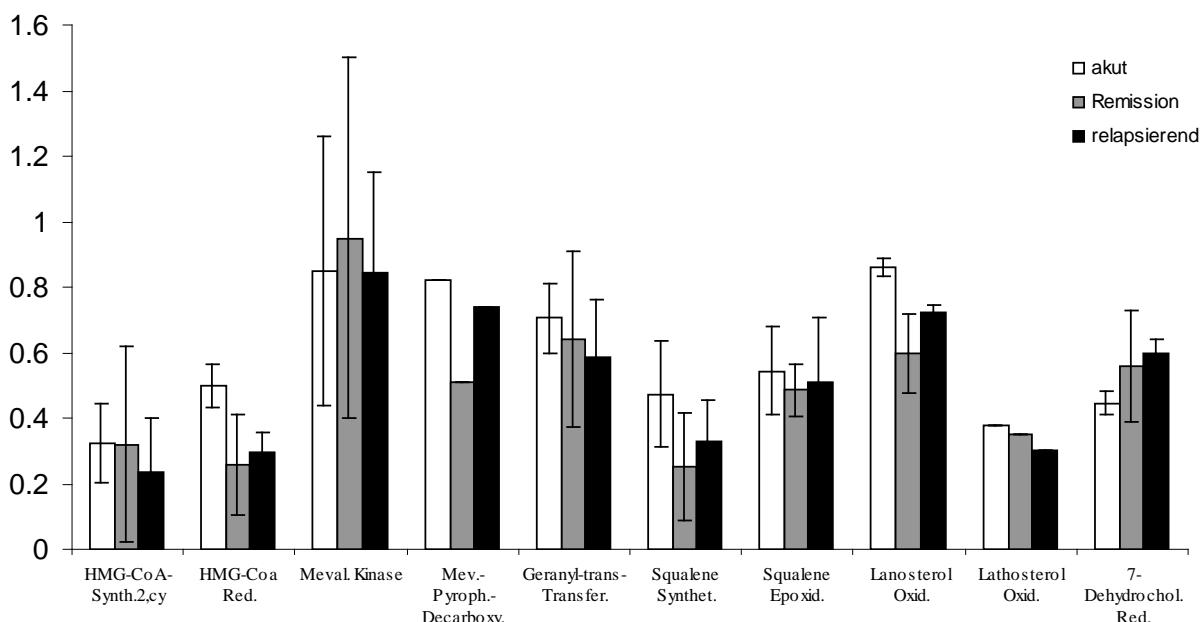


Abbildung 43: Zusammenfassung der Array-Ergebnisse der Cholesterin-Synthesegene. Dargestellt ist jeweils die Expression in der jeweiligen EAE-Phase im Verhältnis zu derjenigen der gesunden Tiere \pm Standardabweichung. Die Standardabweichungen ergaben sich, sofern mehrere Sondensätze mit einem Gen korrelierten.

Phosphorylierung *abgeschaltet* werden, wenn der ATP-Spiegel gering ist (Goldstein and Brown, 1990). Die verringerte Expression der HMG-CoA Reduktase könnte also ein Zeichen für eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von Cholesterin-Derivaten und für das Wiederverwenden des Cholesterins aus den geschädigten Membranen sowie dem Myelin gewertet werden. Auf der anderen Seite könnte natürlich die Erniedrigung des Großteils der aufgeführten Gene auch für eine generelle und nachhaltige Schädigung der Cholesterin synthetisierenden Zellen sprechen. Da aber z.B. die Gene für die Moleküle, die an dem Transport von Cholesterin beteiligt sind, in der Mehrzahl nicht reguliert oder sogar aufreguliert sind, scheidet diese Erklärungsmöglichkeit eher aus.

Einschränkend zu erwähnend ist, dass die meisten Gene auf Proteinebene reguliert werden, was natürlich nicht durch die mRNA-Daten deutlich wird.

Die Expression des Gens für den LDL-Rezeptor (LDL-R) ist in der akuten Phase unverändert, sinkt aber in der Remission und der chronischen Phase auf circa die Hälfte ab. Die Transkription dieses Gens wird ebenso wie die der HMG-CoA Reduktase durch das SRE reguliert. Durch die Präsenz von Cholesterin-Derivaten wird also die Expression von LDL-R ebenso wie die der HMG-CoA Reduktase inhibiert. Dies könnte als ein weiterer Beleg für das intrazelluläre Vorhandensein von Cholesterin-Derivaten und deren *Recycling* während der EAE gesehen werden.

Die Expression von Genen für die Neusynthese von Cholesterin nach der akuten Phase könnte auch deswegen verringert sein, weil das Cholesterin, das von den degenerierten Zellen freigesetzt worden war, von Astrozyten aufgenommen wird und von diesen später für die Regeneration wieder zur Verfügung gestellt wird. Dadurch könnten sich die Neuronen und Oligodendrozyten die sehr energieaufwendige Cholesterin-Neusynthese sparen (Jurevics et al., 2002; Pfrieger, 2003). Dafür spräche ein starkes Vorkommen von Cholesterinestern während der EAE in der Rückenmarksflüssigkeit, die in gesunden Tieren so gut wie gar nicht vorkommen (Dietschy and Turley, 2004).

Darüber hinaus legt die sich über den gesamten EAE-Verlauf erstreckende Reduktion der Expression der Gene der Cholesterin-Synthese nahe, dass die Veränderungen, die durch die EAE bedingt sind, sehr lang anhaltend sind und deshalb nicht ausschließlich mit den Entzündungsreaktionen korrelieren. Sowohl in der Remission als auch in der relapsierenden Phase der EAE müssten dementsprechend Störungen bei der Membran- und/oder Myelinsynthese auftreten.

Dies wird bestätigt durch die kontinuierliche und signifikante Suppression des Gens für den *ATP-binding cassette, sub-family A member 2* (ABC A2-Transporter), ein Transportmolekül

für Cholesterin und zudem ein Marker für aktiv myelinisierende Oligodendrozyten (Tanaka et al., 2003). Seine Expression fällt stark bis zur akuten Phase ab und erholt sich danach wieder leicht, ist allerdings in der Remission trotzdem signifikant niedriger als im ZNS von gesunden Ratten. Über seine Expression auf Endothelzellen der Bluthirnschranke trägt er zudem generell zur Cholesterin-Homöostase im ZNS bei (Ohtsuki et al., 2004) - so dass die Suppression dieses Gens ein Zeichen für den Integritätsverlust der Bluthirnschranke darstellen könnte und damit einhergehend eine generelle Störung des Cholesterin-Stoffwechsels während der EAE andeutet. Möglicherweise könnte dann durch die *Öffnung* der Bluthirnschranke der Fettstoffwechsel im ZNS gestört werden, da dadurch Lipoproteine in das ZNS gelangen können, die normalerweise durch die BBB zurückgehalten werden. In diese Richtung deutet auch eine Untersuchung, in der Meerschweinchen Cholesterin bekamen, worauf sich die Cholesterin-Synthese im ZNS verringerte (Lutjohann et al., 2004). Das vermehrte Diffundieren von Lipoproteinen in das ZNS durch die beeinträchtigte Bluthirnschranke wäre dieser Logik folgend eine weitere mögliche Erklärung für die Suppression der Cholesterin-Synthesegene in dieser Studie. Durch die erhöhte Cholesterin-Konzentration im Rückenmark während des untersuchten EAE-Verlaufs konnte diese Hypothese bekräftigt werden. Neben der Diffusion von Lipoproteinen durch die *defekte* BBB ins ZNS könnte das Infiltrieren von Immunzellen, die Cholesterin in ihren Membranen mit sich tragen, eine Quelle für zusätzliche Cholesterin im entzündeten ZNS sein.

In einer Expressionsstudie, in der das Expressionsprofil der durch die Kupfer-Chelat bildende Verbindung *Cuprizone* ausgelösten Demyelinisierung des *Corpus Callosum* untersucht wurde, konnte ebenfalls eine Expressionerniedrigung der HMG-CoA Reduktase während der Demyelinisierung beobachtet werden; sie wurde in dem Fall als ein Kennzeichen für den Verlust von Myelin gewertet (Jurevics et al., 2002). Im Gegensatz zur der MOG-induzierten EAE von DA-Ratten kam es in der Studie zu einer Erholung der HMG-CoA Reduktase Expression während der Remyelinisierung nach der Absetzung des *Cuprizone*. Anhand dieser Gegebenheiten scheint es möglich, dass es in dem hier untersuchten Tiermodell nur zu einer schwachen Remyelinisierung während der Remission kommt oder dass das benötigte Cholesterin in der EAE im Unterschied zum Cuprizone-Modell nicht *de novo* synthetisiert wird, sondern von anderen bereits erwähnten Quellen stammt.

Cholesterin ist ein Zwischenprodukt bei der Synthese von Steroid-Hormonen wie z.B. Progesteron, Estradiol, Testosteron oder Östrogen. Über die Produktion von Steroid-Hormonen im ZNS ist wenig bekannt. Man weiß aber, dass Neuronen und Gliazellen in der Lage sind, aus Cholesterin bzw. seinem Derivat Pregnenolon Progesterone zu synthetisieren,

die zumindest in der Peripherie außerhalb des ZNS von Schwann-Zellen produziert werden und sowohl para- als auch autokrin die Remyelinisierung stimulieren können (Baulieu et al., 2001). Ähnliches wäre auch im ZNS bei Oligodendrozyten denkbar, so dass die geringere Cholesterin-Synthese einen weiteren negativen Effekt auf die Remyelinisierung haben könnte. Die systemische Applikation von Progesteron in Sprague-Dawley Ratten hatte dementsprechend einen positiven Einfluss auf die Remyelinisierung von Neuronen durch Oligodendrozyten (Ibanez et al., 2004). In *vitro* inhibierte Progesteron außerdem die durch LPS induzierte Stickstoffmonoxid-Synthese von Mikrogliazellen (Lieb et al., 2003).

Die Gabe von Statinen, die die HMG-CoA Reduktase inhibieren, verringert die klinischen Symptome der EAE (Youssef et al., 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Infiltration von T_H1-Zellen und die MHC Klasse II und *MHC class II transactivator* Expression reduziert wurde, die Aktivität von CD40, CD80 und CD86 und die Sekretion von proinflammatorischen Substanzen (z.B. TNF α , NO oder IFN γ) inhibiert wurden und die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen induziert wurde (Stuve et al., 2004). Durch die Gabe von L-Mevanolat, dem Endprodukt der durch die HMG-CoA Reduktase katalysierten Reaktion, konnten die immun modulierenden Eigenschaften der Statine teilweise wieder neutralisiert werden. Statine verhindern zudem die Bildung von Isoprenoid-Intermediaten des Cholesterin-Stoffwechsels, wie Farnesylpyrophosphat oder Geranylgeranylpyrophosphat, die die Aktivität von verschiedenen Mitgliedern der Ras- oder Rho-Proteininasen modulieren, die an der Zellteilung, -wanderung und –reifung beteiligt sind (Liao, 2002). Es gibt auch Statin-Wirkungen, die L-Mevanolat und damit auch Cholesterin unabhängig sind; so binden einige an das Integrin LFA-1, verhindern dadurch dessen Bindung an ICAM-1 und verringern so direkt die Infiltration von Leukozyten ins ZNS (Weitz-Schmidt et al., 2001).

Die Frage, ob die Cholesterin senkende Wirkung der Statine eine Rolle spielt bei der Verbesserung der EAE-Symptome, ist aus den oben genannten Gründen nicht endgültig geklärt. Wenn es aber so wäre, könnte die Reduzierung der Cholesterin-Synthese einen protektiven Effekt haben.

Ionenkanäle, -transporter und Neurotransmitter-Metabolismus

Die Transkripte, die mit Genen für Ionenkanäle, -transporter oder dem Neurotransmitter-Metabolismus assoziiert sind, waren im Verlauf der EAE sehr homogen reguliert. Während der akuten Phase waren alle herunterreguliert und in der Remission in der Regel wieder auf Ausgangsniveau exprimiert.

Dabei sind zwei Moleküle bemerkenswert, das *Synaptic vesicle glycoprotein 2b* und das Protein *Solute carrier family 18, member 3*, da sie beide im Unterschied zu dem Rest dieser Transkripte deutlich während der Remission sogar im Vergleich zu gesunden Tieren aufreguliert waren. Das *Synaptic vesicle glycoprotein 2b* ist speziell in neuronalen Geweben ein Regulator für die Exozytose von synaptischen Vesikeln (Walmsley and Gaines, 2004), bei dem Protein *Solute carrier family 18, member 3* oder *Vesicular acetylcholine transporter* handelt es sich um einen Transporter, der den Neurotransmitter Acetylcholin in die synaptischen Vesikel transportiert.

In der MBP-induzierten EAE von Lewis-Ratten wurden in einer ähnlichen Expressionsstudie ebenfalls die Gene für *Synapsin II* und *SNAP25* neben anderen Genen für synaptische Proteine als herunterreguliert identifiziert (Nicot et al., 2003) – in der MOG-Peptid induzierten EAE von C57BL/6-Mäusen waren u.a. auch die Gene für *Solute carrier family 18, member 3*, *VAMP1*, *SNAP25* und *SNAP29* in der akuten Phase supprimiert. Während der Remission erhöhte sich aber ihre Expression ebenso wie in der vorliegenden Studie wieder (Carmody et al., 2002). Die Folgerungen waren, dass die veränderte Expression von vesikulären Proteinen und veränderte Ausschüttung von Kalzium-Ionen und Neurotransmittern eine gestörte Signalweiterleitung zur Folge haben und somit neben der Demyelinisierung die Hauptgründe für die klinischen Symptome darstellen könnten.

Die stark erniedrigte Expression all dieser Gene während der akuten Phase deutet auf axonale bzw. neuronale Schädigungen hin, die durch die sehr homogene Expressionerniedrigung der ZNS-spezifischen Gene in der akuten Phase bekräftigt werden. Allerdings wäre es auch möglich, dass die Neuronen nicht geschädigt werden, sondern dass sie die Expression der jeweiligen Moleküle aktiv unterdrücken. Entsprechend verhält es sich mit der beobachteten Regulation während der Remission, bei der auch zu untersuchen wäre, ob die Gene durch eine aktive Aufregulation oder dadurch, dass sich die Neuronen im Anschluss an die akute Phase wieder erholen, eine stärkere Expression zeigen.

Neuroregeneration in der EAE der DA-Ratte

Im Verlauf der EAE kommt es neben der Schädigung der Myelinscheiden auch schon früh zu neuronalen bzw. axonalen Schädigungen. Obwohl die Möglichkeiten des ZNS sich zu regenerieren gering sind, kommt es doch besonders in der frühen Phase der Krankheit zu einer Reparatur der Schäden; neben der Remyelinisierung sprossen z.B. auch Axone erneut aus oder Synapsen werden reorganisiert (Lie et al., 2004; Martino, 2004). In dieser Studie sind nicht nur Gene reguliert, die auf eine Schädigung von Neuronen oder glialen Zellen hindeuten. Auch einige Gene sind differenziell reguliert, die im Zusammenhang mit der Regeneration von Axonen und Dendriten bzw. Neuronen stehen.

Die Expression von 39 Sondensätzen, die laut dem Online-Analyseprogramm von Affymetrix *NetAffx* im Zusammenhang mit der Neuroregeneration bzw. dem axonalen Wachstum stehen, sind in der vorliegenden Studie signifikant verändert. Ein Großteil dieser Transkripte (~75%) ist in der akuten Phase supprimiert und während der Remission aufreguliert, während sich die restlichen Gene spiegelbildlich dazu verhalten; das heißt, dass sie in der akuten Phase aufreguliert und während der Remission herunterreguliert sind. Die Regulation von Molekülen, die am Aufbau von Dendritenbäumen beteiligt sind, könnte als ein Zeichen für verloren gegangenen synaptischen Input in der akuten Phase gewertet werden.

Die Funktion der regulierten Gene, die der Neuroregeneration hinzugerechnet wurden, ist sehr heterogen. Einige Moleküle fördern z.B. das Auswachsen von Axonen, wie die Guanin Deaminase *Cypin* oder *Ninjurin 1*, während andere Moleküle wie z.B. *Versican* deren Wachstum eher inhibiert. Zur Verdeutlichung sind die Funktionen einiger der regulierten Moleküle, die im Zusammenhang mit der Neuroregeneration stehen, in der Folge aufgelistet: Die Guanin Deaminase *Cypin* wird im Hippokampus in Neuronen bei der Reifung induziert. Eine Überexpression dieses Enzyms bewirkt eine Vermehrung von primären und sekundären Dendriten, wohingegen eine negative Mutation zur Folge hat, dass weniger Dendriten gebildet werden (Akum et al., 2004). Die *Guanin Deaminase* bindet an Tubulin-Heterodimere und fördert die Aggregation von Mikrotubuli. Die erhöhte Expression dieses Gens könnte also zur Restrukturierung der Neurone bei der Regeneration beitragen und somit den Verlust von synaptischem Input in der akuten Phase der EAE bestätigen.

Das in der akuten Phase aufregulierte, extrazelluläre Matrixglykoprotein *Tenascin C* wird hauptsächlich im ZNS von Astrozyten exprimiert (Steindler et al., 1995) und hat neben der Förderung des Auswachsens von Neuriten (Tucker, 2001) eine negative Wirkung auf die Proliferation von T-Zellen und die Zell-Zelladhäsion; es fördert auf der anderen Seite aber das Rolling von Lymphozyten (Kuznetsova and Roberts, 2004) – *Tenascin C*, das besonders nach Entzündungsreizen induziert wird, ist also in der Lage, das Verhalten von T-Zellen zu

modulieren (Kuznetsova and Roberts, 2004) und zur Regeneration der Neurone beizutragen. Es ist auch in der MOG-Peptid induzierten EAE von C57Bl/6-Mäusen aufreguliert (Carmody et al., 2002).

Bei *Chondroitin Sulfate Proteoglycan 2* (Versican), das ebenfalls in der akuten Phase aufreguliert ist, handelt es sich um ein von Oligodendrozyten produziertes, extrazelluläres Matrixprotein (Asher et al., 2002), dessen Expression mit der Myelinisierung verknüpft ist (Bignami et al., 1993). Seine einzige bekannte Funktion ist die Hemmung des Wachstums von Axonen. Das Expressionsprofil von *Fibrillin-1*, ebenfalls ein neurales Strukturmolekül (Carmody et al., 2002), sieht sehr ähnlich aus – ebenso wie *Versican* wurde seine erhöhte Expression in der EAE als ein Zeichen dafür gesehen, dass der Unterhalt bzw. der Wiederaufbau von neuralen Strukturen ein wichtiger Mechanismus der Reparation der durch die Entzündung verursachten Schädigungen darstellt (Carmody et al., 2002).

Ninjurin 1 (nerve injury-induced Protein), das in der MOG-Peptid induzierten EAE von C57Bl/6-Mäusen ähnlich aufreguliert war wie in der vorliegenden Studie (Carmody et al., 2002), ist ein Adhäsionsmolekül, das in Neuronen und Oligodendrozyten nach Verletzungen aufreguliert ist. Es fördert Bildung und Wachstum von Neuriten, indem es den Kontakt zwischen Neuronen und Oligodendrozyten stabilisiert (Kubo et al., 2002).

Unter den in der akuten Phasen herunterregulierten Genen befindet sich *Fasciculation and elongation protein zeta-1* (Fez1), das in sich entwickelnden Neuronen exprimiert wird und durch die Interaktion mit dem Protein *Disrupted-In-Schizophrenia 1* (DISC1), einem intrazellulären Transportprotein, auf noch unbekannte Weise zum Wachsen von Axonen beiträgt (Honda et al., 2004). Eine Herunterregulation von *Fez1* während der akuten Phase könnte zumindest die axonale Regeneration verringern, die durch *DISC1* bedingt ist. Es scheint also, dass die Herunterregulation von *Fez1* besonders während der akuten Phase, aber auch in den späteren Phasen der EAE der neuronalen Regeneration entgegenwirkt.

Die *Calcium/calmodulin-dependent Protein kinase II* (CaMKII), deren gamma-Untereinheit in der akuten Phase der EAE herunterreguliert ist, ist eine neuronale Protein-Kinase, die besonders stark in Neuronen exprimiert und durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert wird. Sie moduliert z.B. die Synthese von Neurotransmittern oder die Funktionen von Neurotransmitter-Rezeptoren und Ionenkanälen (Colbran, 2004). Die Reduktion der CaMKII γ -Expression könnte also ein Zeichen dafür sein, dass die neuronale Signalaktivität während der EAE reduziert wird. Auf der anderen Seite ist eine vermehrte Aktivität der CaMKII eine Hauptursache für neuronale Schäden unter pathologischen Bedingungen, und die Inhibition dieser Kinase führte zu einer Protektion der Neuronen

gegenüber der Beta-Amyloid induzierten Apoptose, die bei der Entstehung von Alzheimer eine Rolle spielt und deren Mechanismus noch weitestgehend unklar ist, indem die Aktivitäten der Kaspasen-2 und –3 erniedrigt werden (Lin et al., 2004). Dementsprechend könnte die erniedrigte Expression von CaMKII vielleicht auch einen Schutz vor Apoptose darstellen.

Der *Endothelin receptor type B* ist in der akuten Phase herunterreguliert und in der Remission anschließend sogar im Vergleich zu gesunden Tieren aufreguliert. Es handelt sich dabei um einen 7-Transmembranrezeptor (Paglinawan et al., 2003), der im ZNS von Astrozyten und Neuronen produziert werden kann und bei zerebralen Verletzungen – ebenso wie sein Ligand Endothelin 3 - aufreguliert ist (Lee et al., 2003; Rogers et al., 2003). Es wird vermutet, dass er zu der Transformation von Astrozyten zu reaktiven Astrozyten beiträgt. Die Gabe eines Antagonisten des *Endothelin receptor type B* verringerte die Anzahl reaktiver Astrozyten. Neben dieser für das ZNS negativen Wirkung wurde aber auch publiziert, dass dieser Rezeptor für die Migration von neuronalen Vorläuferzellen zumindest außerhalb des ZNS in der Peripherie notwendig ist (Lee et al., 2003). Zur Einschätzung der Bedeutung der Regulation dieses Molekül wäre es notwendig zu wissen, welchen Anteil jeweils Astrozyten und Neuronen daran haben – um dies festzustellen, böte sich entweder eine in InSitu-Hybridisierung oder auf Proteinebene die Durchführung einer Immunhistochemie an.

Neuronatin, dessen Expression in der akuten Phase erniedrigt war, wird von Neuronen exprimiert. Über seine Funktion ist bisher wenig bekannt, außer dass es ein Regulator für Ionenkanäle während der Gehirn-Entwicklung sein könnte. Seine besonders starke Expression im Gehirn von Föten sowie Neugeborenen deutet jedoch an, dass es auch die Entwicklung des Nervensystems beeinflusst (Dou and Joseph, 1996). Die Transfektion von PC12-Zellen (Klon 1.9), die kein Neuronatin exprimieren, mit einem Expressionskonstrukt für Neuronatin verringert die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber den Zellgiften *Nigericin*, *Rotenone* und *Valinomycin* deutlich. Dies weist auf einen neuroprotektiven Effekt dieses Moleküls hin (Zheng et al., 2002).

Im ZNS ist das Gen für *Lifeguard* (FAS apoptotic inhibitory molecule 2; homolog zu neural membrane protein 35 (NMP35)) in allen untersuchten EAE-Phasen niedriger exprimiert als in gesunden Tieren. Dieser hauptsächlich in Neuronen exprimierte antiaoptotische Faktor bindet spezifisch an FAS und verhindert die durch FasL-ausgelöste Apoptose, ohne die Interaktion von FAS mit dem FasL und dessen Rekrutierung von FADD zu verhindern (Schweitzer et al., 2002). Da die einzige bisher bekannte Funktion von *Lifeguard* die Protektion von Neuronen

vor der Apoptose ist, dürfte die Herunterregulation dieses Gens während der EAE Neurone empfindlicher für die Induktion der Apoptose machen.

In einer ähnlichen Studie, in der die Expressionsveränderungen während der MOG-Peptid induzierten EAE von C57Bl/6-Mäusen untersucht wurden, wurde die Aufregulation von *Ninjurin-1*, *Tenascin-C*, *Versican* sowie *Fibrillin-1* besonders in der akuten Phase, aber auch während der Remission bestätigt und als Antwort des ZNS gewertet, um die durch die Entzündung bedingten Schäden zu beheben (Carmody et al., 2002).

Einige der aufregulierten Gene wie z.B. *Cypin*, *Tenascin C* oder *Versican*, die im Zusammenhang mit Neuroregeneration stehen, oder die Suppression einer Untereinheit der CaMKII deuten daraufhin, dass dieser Prozess bereits in der akuten Phase eingeleitet wird. Auf der anderen Seite sind Moleküle, wie z.B. *Lifeguard* oder *Neuronatin* herunterreguliert, von denen u.a. bekannt ist, dass sie einen neuroprotektiven Charakter haben. Ob die durch die Expressionerniedrigung reduzierte antiapoptotische Wirkung eine Rolle spielt, oder ob wie z.B. im Fall von Neuronatin dessen Einfluss auf die Ionenkanäle von größerer Bedeutung ist, wäre noch zu klären.

Es lässt sich kaum ein genereller Trend bezüglich der Expression von Molekülen, die im Zusammenhang mit der neuronalen Regeneration stehen, ausschließlich anhand der vorliegenden Expressionsdaten treffen. Es ist aber trotzdem erwähnenswert, dass sich das Expressionsmuster der beteiligten Moleküle schon beginnend mit der akuten Phase stark verändert, woraus sich ableiten lässt, dass regenerative Prozesse von den Vorgängen während der EAE stark beeinflusst werden.

Protein degradation und Antigenpräsentation in der MOG-induzierten EAE

Die Proteasomen sind hochselektive, im Zytoplasma und im Zellkern lokalisierte Proteinasekomplexe. Sie bestehen aus zwei komplexen Teilkomponenten, dem zylindrischen 20S Kernpartikel (oder auch 20S Proteasom) sowie einem 19S Cap-Partikel, der an die Enden des 20S Kernpartikels andockt. Es hat sich herausgestellt, dass das Proteasom essentiell für das Leben der Zelle ist und die Aufgabe hat, eine Vielzahl von Proteinen auf bestimmte Signale hin abzubauen. Dieser dann eintretende Proteinabbau ist für die Zelle lebensnotwendig. So werden auf bestimmte Signale hin metabolische Enzyme, Transkriptionsfaktoren oder auch den Zellzyklus regulierende Proteine wie Zykline, CDK-Inhibitoren oder Zellzyklusregulatoren abgebaut.

Diese Funktionen machen das Proteasom zu einem zentralen Schalter innerhalb der Zelle. Als dieser und insbesondere auch wegen seiner Funktionen im Zellzyklus wird das Proteasom als ein mögliches Zielmolekül für die Therapie verschiedener Krankheiten, u.a. des Krebses, angesehen.

Viele autoimmune, entzündliche Prozesse hängen direkt oder indirekt von der Aktivität des Proteasoms ab. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Generierung von Peptid-Liganden für die Präsentation von Antigenen auf MHC Klasse I-Molekülen. Zudem ist das Proteasom für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB notwendig, der sehr viele proinflammatorische Gene reguliert. Die Inhibierung des Proteasoms verringerte den proteolytischen Abbau des ubiquitinierten NF-κB Inhibitors IκB, wodurch es zu einer geringeren Expression von NF-κB-induzierten Genen kommt (Read et al., 1995). Die Inhibierung des Proteasoms hatte einen positiven Einfluss auf den Verlauf der PLP-induzierten EAE von SJL/J-Mäusen und Lewis-Ratten (Hosseini et al., 2001; Vanderlugt et al., 2000).

Eine große Anzahl von Molekülen, die im Zusammenhang mit dem Proteinabbau allgemein bzw. speziell mit dem Proteasom stehen, waren besonders in der akuten Phase der EAE aufreguliert. In der Remission kam es dann bei einem Großteil dieser Gruppe zu einer Verminderung der Expression. In der relapsierenden Phase ist der Trend zwar wegen der Heterogenität der Hybridisierungen geringer, aber ein erneuter Anstieg der Expression von Genen, die mit der Proteindegradation zusammenhängen, ist in dieser Phase nach der Remission trotzdem auffallend.

Besonders auffallend ist die verstärkte Expression von Bestandteilen des 20S Proteasoms, die nur in den Immunproteasomen vorkommen (LMP2 und LMP7) sowie der α - und β -Untereinheiten des Proteasomaktivators (Psme oder PA28). Diese Moleküle werden durch Zytokine wie IFN γ induziert und führen zu einer effizienten Antigenprozessierung für die Präsentation von viralen Peptiden auf MHC Klasse I-Molekülen (Kloetzel and Ossendorp, 2004). Neben Molekülen, die größtenteils eine Rolle bei der Präsentation von endogenen Antigenen auf MHC Klasse I-Molekülen spielen, sind viele Proteasen aufreguliert, die in Endo- und Lysosomen hauptsächlich exogene Antigene für die Präsentation auf MHC Klasse II-Molekülen prozessieren. Darunter befinden sich auch die Cathepsine, von denen eine große Anzahl, aber besonders Cathepsin C und Y, die von Immunzellen produziert werden. Sie wurden im Verlauf der EAE signifikant aufreguliert. Dies spricht zunächst für einen verstärkten Proteinabbau und damit verbunden wohl auch für eine verstärkte, lokale Präsentation von Antigenen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) im ZNS

während der akuten und später während der relapsierenden Phase der EAE. Der Hauptteil der APCs stammt dabei aus der Peripherie und dringt erst während der EAE in das ZNS ein. Aber auch die residenten Mikroglia präsentieren nach Aktivierung im größeren Umfang Antigene auf MHC-Klasse II-Molekülen (Juedes and Ruddle, 2001).

Die erhöhte Expression von Genen der Cathepsin-Familie während der MS bzw. EAE wurde bereits in einigen Publikationen gezeigt. Die Cathepsine C, D, H und S wurden sowohl in der MOG-Peptid-induzierten EAE von C57Bl/6-Mäusen (Ibrahim et al., 2001) als auch bei der spontanen EAE von MBP-Ac1-11-spezifischen T-Zellrezeptor transgenen C57Bl/6-Mäusen (Matejuk et al., 2003) stark aufreguliert gefunden. Komponenten des Proteasoms, die in der vorliegenden Untersuchung reguliert waren, wurden in anderen Studien ebenfalls reguliert gefunden. Die Gene für *Proteasome subunit, beta type, 8 (Psmb8)*, *Proteasome subunit, beta type 9 (Psmb9)*, *Protease 28 subunit alpha, Lysosomal-associated Protein 5* und *Interferon-γ inducible protein 30* wurden z.B. in der MOG-Peptid-induzierten EAE von C57Bl/6-Mäusen als hochreguliert bewertet (Ibrahim et al., 2001).

Die Aufregulation von MHC Klasse I-Transkripten ist nicht nur auf die Expression infiltrierender Zellen, sondern auf die durch das proinflammatorische Milieu stark aufregulierte MHC-Klasse I-Expression von ZNS residenten Zellen zurückzuführen. Neben der Expression von MHC-Molekülen ist erwähnenswert, dass das Gen des *Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (TAP1)* aufreguliert ist. Bei TAP handelt es sich um einen ABC-Transporter, dessen Funktion es ist, hauptsächlich endogene Peptide in das Endoplasmatische Retikulum zu transportieren, damit sie dort auf MHC-Klasse I-Moleküle geladen werden können.

Der Anstieg der Expression von Protein abbauenden Enzymen im ZNS ist ein Hinweis für eine verstärkte Aktivierung von Immunzellen durch eine vermehrte Präsentation von Antigenen sowie für eine vermehrte Transkription von proinflammatorischen, NF-κB-induzierten Genen. In der Remission vermindert sich im Vergleich zur akuten und relapsierenden Phase die Anzahl dieser Transkripte – ein Indiz für eine verminderte Aktivierung bzw. Anwesenheit von Immunzellen im ZNS während der Remission.

Im Gegensatz dazu steht das Enzym *Ubiquitin carboxy terminal Hydrolase-L1 (UCH-L1)*, das spezifisch in Neuronen das Ubiquitin nach dem Abbau des Zielproteins regeneriert (Larsen et al., 1998). *UCH-L1* ist über den gesamten untersuchten Verlauf der EAE signifikant herunterreguliert, was gegen einen vermehrten Proteinabbau spricht, denn die Regenerierung von Ubiquitin-Monomeren ist unerlässlich für den kontinuierlichen Proteinabbau durch das Proteasom. Ebenfalls herunterreguliert ist das neuronenspezifische Molekül *Neural F box*

protein NFB42, das an der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligt ist (Erhardt et al., 1998). Dessen Expressionsabnahme bedeutet ebenso wie die von UCH-L1, dass der Proteinabbau eingeschränkt sein könnte.

Dendritische Zellen in der EAE

Das ZNS gilt als immun privilegierter Raum. So ist beispielsweise die Expression von MHC-Klasse II Molekülen minimal (Waldburger et al., 2001). Zudem können Immunantworten z.B. durch die Bluthirnschranke oder die konstitutive Expression von TGF β sowie des FasL unterdrückt werden (Bechmann et al., 2002; Wilbanks and Streilein, 1992). In pathologischen Situationen werden MHC-Klasse II- und kostimulatorische Moleküle auch im ZNS exprimiert, was daraufhin deutet, dass es auch dort zu einer lokalen Antigenpräsentation durch ZNS-Mikroglia und infiltrierende professionelle antigenpräsentierende Zellen kommen kann. 1996 wurde erstmals ein DC-spezifisches Antigen (OX62) im ZNS von Ratten gefunden, die an EAE erkrankt waren (Matyszak and Perry, 1996). Später konnten auch bei SJL- und C57Bl/6-Mäusen DCs im ZNS mittels Immunhistochemie oder FACS-Färbung nachgewiesen werden, bei denen mit PLP bzw. MOG-Peptid EAE induziert worden war (Serafini et al., 2000; Suter et al., 2000). In den beiden Tiermodellen ging die Infiltration von DCs derjenigen von T-Zellen und dem Krankheitsbeginn voran. Es wurden u.a. deswegen spekuliert, dass dendritische Zellen zumindest in diesen beiden Krankheitsmodellen eine Schlüsselrolle bei der Initiierung der EAE innehaben könnten (Serafini et al., 2000).

Die vorliegenden Daten deuten die Präsenz von DCs im ZNS in der MOG induzierten EAE von DA-Ratten an. Denn unter den am stärksten regulierten Transkripten dieser Studie befinden sich einige Gene, die für Dendritische Zellen spezifisch sind. Für die DC-spezifischen Oberflächenantigene CD11c und OX62 befinden sich leider keine Sonden, auf den benutzten Microchips, so dass über dessen Regulation keine Aussagen gemacht werden konnten.

In der DA-Ratte sind DC-assoziierte Gene besonders stark während der akuten Phase hochreguliert, was vermuten lässt, dass sie eine wichtige Funktion bei der lokalen Aktivierung von Effektorzellen haben könnten. In dieser Phase war auch das Chemokin CCL20 (früher MIP-3 α) 21-fach aufreguliert. CCL20 bewirkt eine Rekrutierung von DCs besonders in entzündete Gewebe (Serafini et al., 2000); in der Remission sowie der relapsierenden Phase der EAE war CCL20 im Vergleich zu gesunden Tieren nicht mehr reguliert.

Im Anschluss an die akute Phase kam es in der Remission zu einer Abnahme der DC-assoziierten Transkripte. Eine Verringerung der Zahl der DCs im Rückenmark könnte ein wichtiger Faktor für die gleichzeitig auftretende Verringerung der Zahl der Effektorzellen im ZNS sein. Im weiteren Verlauf der EAE kam es wieder zu einer leichten Erhöhung der Expression von DC-spezifischen Genen im ZNS.

Dass die im ZNS während der EAE auftretenden DCs nicht die Funktion haben, naive T-Zellen zu aktivieren, sondern im Gegenteil die Funktionen von aktivierten T-Zellen im ZNS zu unterdrücken, wurde bereits aufgrund von Ergebnissen aus der MOG-Peptid induzierten EAE von C57Bl/6-Mäusen vermutet. Die Dendritische Zellen im ZNS hatten einen unreifen Phänotyp und verringerten *in vitro* die Proliferation von aktivierten T-Zellen durch die Sekretion von TGF β , IL10 und Trail (Suter et al., 2003).

Bei dem Molekül GPNMB handelt es sich um glykosiliertes Transmembranprotein, dessen Expression bisher in Dendritischen Zellen (Ahn et al., 2002) und in stark invasiven Melanomzellen nachgewiesen wurde (Weterman et al., 1995). DBA/2J-Mäuse, die eine dominant negative Mutation von GPNMB haben, entwickeln eine Form von Pigmentglaukomen, die dem humanen Pigmentdispersionssyndrom ähnlich sind (Mo et al., 2003). Es wird vermutet, dass die Pigmentablagerung in den Augen der DBA/2J durch eine Immundysfunktion bedingt ist. Da Leukozyten, Neutrophile sowie mononukleäre Zellen bei diesen Mäusen im Auge gefunden wurden, könnte GPNMB bei der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs im Auge eine Rolle spielen. Eine ähnliche Rolle wäre bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen denkbar.

DORA (IGSF6) ist ebenso ein Transmembranprotein, das hauptsächlich in unreifen CD11+ DCs exprimiert und nach der Ligation von CD40 herunterreguliert wird (Bates et al., 1998). Es wird spekuliert, dass es an der Aufnahme von Antigenen in die DCs sowie deren Homing und Zirkulation beteiligt ist (King et al., 2003).

Durch die erstmals beschriebene Aufregulation von GPNMB und DORA in der EAE ergeben die vorliegenden Daten somit interessante Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen zur Klärung der genauen Rolle dieser Moleküle für die DCs während der EAE.

Die Rolle von TGF β in der MOG-induzierten EAE von DA-Ratten

TGF β ist ein Zytokin mit ausgeprägt immunsuppressiven Wirkungen, spielt eine bedeutende Rolle bei der der Regulation von Autoimmunvorgängen und ist deswegen ein sehr interessantes Target für die Therapie von Autoimmunkrankheiten. Es wird von einer Vielzahl

von Zellen freigesetzt – u.a. auch Immunzellen wie T-Zellen und Makrophagen und wirkt hauptsächlich über die Typ I und II TGF β -Rezeptoren, die in fast allen Geweben exprimiert werden (Prud'homme and Piccirillo, 2000). Neben der Apoptose von Effektorzellen wird die verstärkte Sekretion von TGF β , das u.a. die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. von IFN γ oder LT/TNF verringert, als ein wichtiger Faktor für die Herunterregulation der EAE im Anschluss an die akute Phase angesehen (Karpus and Swantborg, 1991). Die systemische Gabe von TGF β war in der Lage, die klinischen Symptome von verschiedenen EAE-Modellen zu verringern (Johns et al., 1991; Kuruvilla et al., 1991; Racke et al., 1991).

In der vorliegenden Studie kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der TGF β -Expression im Verlaufe der EAE – in der akuten und der relapsierenden Phase ist seine Expression insignifikant höher als im Rückenmark von gesunden Tieren. Dies wird bestätigt durch eine RNA-Expressionsstudie aus dem Jahr 1996, in der TGF β im ZNS der DA-Ratte während der MBP-induzierten EAE gar nicht produziert worden war. Die Lewis-Ratte unterscheidet sich dabei von der DA-Ratte, da es bei ihnen während der Remission zu einer Aufregulation von TGF β kam. In diesem Kontext wurde dahingehend spekuliert, dass die fehlende Induktion von TGF β während der EAE ein Grund für hohe Anfälligkeit der DA-Ratten wäre (Issazadeh et al., 1996).

Diejenigen Gene, die eine Funktion innerhalb des TGF β -Signalwegs besitzen, sind in der vorliegenden Studie nicht sonderlich stark reguliert. Von den bekanntermaßen durch TGF β induzierten Genen werden nur der *Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)* und der *Transforming growth factor-beta -induced factor (TGIF)* signifikant in zumindest einer der untersuchten Phasen aufreguliert. Bei Smad6 zeigt nur einer von vier Sondensätzen eine starke, aber insignifikante Verstärkung der Expression – Smad7 ist über den gesamten untersuchten EAE-Verlauf im Rückenmark etwas weniger exprimiert als bei gesunden Tieren. Beide Gene werden durch TGF β induziert – bei einer starken Sekretion von TGF β wäre es also zu erwarten gewesen, dass beide Moleküle aufreguliert wären.

Die Gene, deren Expression laut anderer Publikationen durch TGF β gehemmt wird, sind in dieser Studie kaum supprimiert. Lediglich *Cadherin 1* wird im Verlauf der EAE leicht supprimiert. Dabei handelt es sich um ein Ca⁺⁺-abhängiges interzelluläres Adhäsionsmolekül, das bei der embryonalen Entwicklung des Gehirns bei Mäusen von Bedeutung ist (Matsunami and Takeichi, 1995). Ansonsten durch TGF β gehemmte Gene sind entweder nicht supprimiert oder wie die Zellzyklusregulatoren *c-Myc* und *Cyclin A2* sogar induziert.

Die laut Literatur aufregulierten Gene lassen sich im Gegensatz zu den supprimierten auch in der vorliegenden Studie wiederfinden. Die Regulation ungefähr eines Drittels der identifizierten Gene tendiert in der vorliegenden Studie in die gleiche Richtung wie in den Expressionsstudien, die die TGF β –abhängige Regulation der betreffenden Gene charakterisiert hat. Außer Smad7 ist nur ein weiteres dieser Gene nicht induziert, sondern supprimiert. Dabei handelt es sich um den Transkriptionsfaktor *Core binding factor, runt domain, alpha subunit (CBFA2)*, der für die Entwicklung von erythrogenen und lymphoiden Vorläuferzellen von Bedeutung ist (Westendorf and Hiebert, 1999).

Weder mehrere Moleküle des TGF β -Signalwegs noch ein größerer Anteil der Gene, von denen bekannt ist, dass ihre Expression durch TGF β reguliert wird, zeigen eine deutliche Veränderung ihrer Expression in irgendeiner der untersuchten Krankheitsphasen. Die Expressionswerte der inhibitorischen Smads 6 und 7, die als Maß für die Stärke und Dauer der TGF β -Signalgebung gesehen werden können (Miyazawa et al., 2002), legen nicht nahe, dass im ZNS der EAE-Tiere eine verstärkte TGF β -Signaltransduktion stattfindet.

Der auf den ersten Blick überraschende Befund der geringen Regulation der Gene des TGF β Systems lässt verschiedene Interpretationen zu:

1. Die Expressionsstudien, aus denen die Liste der durch TGF β regulierten Gene extrahiert wurde, wurden mit epidermalen Zellen durchgeführt – einem Zelltyp, der im ZNS nicht vorkommt. Da die Expressionsstudien mit den Epithzellkulturen die umfangreichsten waren, die zu finden waren, wurden sie aber trotzdem für diesen Vergleich verwendet.
2. Die zelluläre Zusammensetzung des EAE-ZNS unterscheidet sich durch die infiltrierenden und die zugrunde gehenden Zellen wesentlich vom gesunden ZNS. Dadurch könnte die Suppression von Genen durch TGF β verdeckt werden.
3. Die erwarteten durch TGF β vermittelte Regulation könnten sich weniger auf RNA-Ebene abspielen als auf Proteinebene.
4. Die große Anfälligkeit von DA-Ratten für die EAE könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei ihnen die Herunterregulation von Entzündungen durch TGF β generell eingeschränkt ist (Issazadeh et al., 1996; Lukic et al., 2001).

B-Zellen in der MOG-induzierten EAE von DA-Ratten

Die von T-Zellen vermittelte Immunität beherrschte ursprünglich die Studien über die Pathogenese der MS bzw. EAE. Jedoch geriet die Rolle der humoralen Immunität bei der

Entstehung und dem Fortbestand von Läsionen stärker in den Vordergrund. So wurden z.B. in einer Vielzahl von MS-Patienten Anti-Myelin Antikörper produzierende B-Zellen gefunden (Genain et al., 1999; Lolli et al., 1991). Der Austausch des Plasmas kann bei einigen MS-Patienten zu einer Verbesserung der Krankheit führen (Kieseier and Hartung, 2003). Die Gabe von anti-MOG Antikörpern induzierte Demyelinisierungen in der MBP-induzierten EAE von Lewis-Ratten, bei der es normalerweise nicht zu einer Demyelinisierung kommt (Linington et al., 1992). Die MOG-induzierte EAE der DA-Ratte zeichnet sich unter anderem durch Entstehung von Antikörper-vermittelten demyelinisierten Typ II-Läsionen aus (Adelmann et al., 1995; Johns et al., 1995).

Kürzlich wurde beschrieben, dass es während der EAE und MS zur Ausbildung von sogenannten tertiären Lymphfollikeln innerhalb der Hirnhaut kommt. Es wurde postuliert, dass in derartigen Lymphfollikeln pathologische B-Zellantworten ausgelöst und aufrechterhalten werden können (Maglione et al., 2004; Serafini et al., 2004). Die Moleküle BAFF und CXCL13 sind in der vorliegenden Studie laut Microarray-Expressionsstudie und RealTime-PCR aufreguliert. CXCL13 wird besonders von follikulären Dendritischen Zellen exprimiert und fördert das *Homing* von B-Zellen in Lymphgewebe; BAFF, das von Makrophagen, Monozyten und DCs exprimiert wird, ist ein antiapoptotischer und kostimulatorischer Faktor für B-Zellen dessen Überproduktion zu spontanen Autoimmunkrankheiten führt (Mackay et al., 1999). In verschiedenen relapsierenden EAE-Modellen sind diese Moleküle für die Funktion der bereits erwähnten tertiären Lymphfollikel wichtig (Maglione et al., 2004). Die erhöhte Expression dieser Moleküle könnte also zur Akkumulation von B-Zellen im Rückenmark und zum Unterhalt der Immunreaktionen beitragen.

Überraschenderweise konnte anhand der Expression von B-Zell-spezifischen Genen, besonders von Immunglobulinen, nicht belegt werden, dass sich im Verlauf der EAE im ZNS mehr B-Zellen befinden als bei gesunden Tieren. Einzig die erhöhte Expression von *Syndecan-1* (CD138) deutet auf eine Präsenz von B-Zellen im Rückenmark hin. *Syndecan-1* wird sowohl von Prä-B-Zellen als auch von Antikörper-produzierenden Plasmazellen exprimiert (Sanderson et al., 1989).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie fanden Carmody und Kollegen in der MOG-Peptid (AS 38-50) induzierten EAE von C57Bl/6-Mäusen eine starke Aufregulation vieler Immunglobulin-Gene während der akuten Phase und besonders während der Remission (Tabelle 29) (Carmody et al., 2002). In dieser Studie wurden ebenfalls Affymetrix Mikroarrays verwendet, und die Präsenz von Antikörper-produzierenden B-Zellen wurde mittels Immunhistochemie gezeigt.

Immunglobuline	UniGene Code	gesund	akut	Remission
Igh-VDJ-2F7	X94418	0	0	389,09
Igh-V	AF036736	0,29	0,88	13,42
Igh-V	L33943	0	1	5,93
Igh-V	L33943	0,41	1	5,93
Igh-V	U10410	0,50	0,78	5,42
Igh-V	L33952	0,39	1	1,82
Igh-V	AF025445	0,33	1	6,28
Igh-V	U55576	0,19	1	8
Igk-V28	M18237	0,16	1	6,25
Igh-V186.2	AF065324	0,58	1	3,02
Igh-Ca	J0045	0,33	1	12,58
Igh-Cg2b	X67210	0,43	1	6,34
Igh-Cg1	V00793	0	0	69,86
Ig-J	M90766	0,79	1	3,28
Igk-C	M80423	0	1	7,8
Igk-V	AB017349	0,71	1	3,49
Igk-V	U19315	0,67	1	2,44
Igh-VDJ-1F6	U62386	0,46	1	5,21
Igh-VII H8	X02463	0,56	1	2,30
Igh-VII H17	X02466	0,73	1	4,10

Tabelle 29: Zusammenfassung der aufregulierten Immunglobulin-Gene in der akuten Phase und der Remission in der MOG-Peptid-induzierten EAE von C57Bl/6-Mäusen (geändert nach (Carmody et al., 2002)). Dargestellt sind die gegen den jeweilige Median-Wert normalisierten Expressionswerte, die mit der Maus-Chip-Serie MG U74 bestimmt worden sind.

In der MOG-induzierten EAE von DA-Ratten haben Antikörper eine bedeutende Rolle bei der Demyelinisierung haben (Storch et al., 1998). Bei der MOG-Peptid-induzierten EAE von C57Bl/6-Mäusen sollen Antikörper bzw. B-Zellen dagegen nicht wesentlich an der Läsionspathogenese beteiligt sein. So zeigen B-Zell-defiziente C57Bl/6-Mäuse eine „normal“ verlaufende Form der EAE, die zudem auch Demyelinisierungen aufweist (Hjelmstrom et al., 1998). Carmody et al. folgern aus der starken Aufregulation von B-Zellgenen während der Remission, dass die Antikörper entweder an der Erholung beteiligt sind – z.B. durch Erleichterung der Phagozytose von Effektorzellen - oder dass sie „nur“ ein Anzeichen für einen Wechsel von einer Th1- zu einer Th2-Zytokinantwort während der Remission sind (Carmody et al., 2002).

Dass B-Zellgene während der EAE der DA-Ratten nicht im verstärkten Maß innerhalb des ZNS zu finden waren, obwohl per ELISA anti-MOG-Antikörper im Serum festgestellt wurden, könnte dadurch erklärt werden, dass sie außerhalb des ZNS produziert worden sind (z.B. in den Lymphknoten nahe am Injektionsort des Immunisierungsreagens). Das Vorhanden von MOG-Antikörpern bedeutet übrigens nicht automatisch, dass es auch zu Antikörper bedingten Demyelinisierungen kommt, da auch Patienten ohne eine demyelinisierende Erkrankung einen hohen anti-MOG-Antikörpertiter haben können. Das Epitop, gegen das die

MOG-Antikörper gerichtet sind, ist von entscheidender Bedeutung für die Demyelinisierung – so scheint es, dass eher Antikörper gegen diskontinuierliche, konformationelle MOG-Epitope bei Primaten demyelinisierend wirken als diejenigen gegen kontinuierliche, lineare Epitope (Mathey et al., 2004).

Die Rolle der hohen BAFF- und CXCL13-Expression im vorliegenden EAE-Modell ist noch unklar. Eine Möglichkeit diese näher zu bestimmen, wäre eine funktionelle Ausschaltung dieser Moleküle z.B. durch Antikörper

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in der EAE

Das am stärksten in der EAE aufregulierte Gen dieser Studie war dasjenige für SLPI, das besonders in der akuten Phase, aber auch in den anderen Phasen im Vergleich zu gesunden Tieren sehr stark überexprimiert war. Bei ihm handelt es sich um ein 11,7 kDa großes sezerniertes Molekül, das von Astrozyten, Neuronen, Epithelzellen, Neutrophilen und Makrophagen produziert wird (Wang et al., 2003). Neben der Hemmung von Proteininasen, die von verschiedenen aktivierten Leukozyten produziert werden und eine bedeutende Rolle als Effektormoleküle in der EAE spielen, hat es noch andere Eigenschaften, wie z.B. die Verhinderung der Aktivierung von NF-κB, indem es den proteolytischen Abbau von IκB inhibiert, wobei der Mechanismus dafür noch nicht ausreichend bekannt ist. Zudem besitzt es antimikrobielle Wirkungen gegen Bakterien, Pilzen und einigen Viren wie HIV-1 oder Influenza A (Hiemstra, 2002). SLPI kann an das Protein *Scramblase* binden, das die Bewegung von Phospholipiden innerhalb der Zellmembran beeinflusst. Es wurde postuliert, dass die Membran durch diese Bindung stabilisiert wird, wodurch z.B. das Eindringen von HIV-1 in die Zelle verhindert wird (Tseng and Tseng, 2000).

Es ist bekannt, dass die Expression von SLPI in Astrozyten und Neuronen nach einer Ischämie induziert wird und dass dessen Überproduktion den klinischen Verlauf nach einer Ischämie verbessert und das Infarktvolumen reduziert (Wang et al., 2003). In Lungen-Endothelzellen verringert es die Expression von ICAM-1 bei Entzündungen und dadurch die Akkumulation von Neutrophilen (Lentsch et al., 1999) – im gleichen Zelltyp konnte SLPI die Expression vom *hepatocyte growth factor* (HGF) induzieren (Kikuchi et al., 2000). Interessanterweise fördert HGF u.a. die Proliferation und Migration und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Yan and Rivkees, 2002).

Die entzündungsregulierenden Effekte und das therapeutische Potenzial in der Ischämie deuten an, dass der SLPI-Aufregulation in ZNS-Läsionen eine antiinflammatorische,

protektive Rolle zukommt. Das heißt, dass die Aufregulation von SLPI während der EAE einen protektiven Mechanismus darstellen könnte. Darüber hinaus legt die Induktion von HGF durch SLPI in Lungen-Epithelzellen nahe, dass es auch einen Beitrag zur neuronalen Regeneration leisten könnte. Um die Rolle von SLPI in der EAE zu klären, wäre es sinnvoll, eine Überexpression von SLPI in EAE-Tieren zu simulieren, z.B. durch die Injektion des rekombinanten Proteins oder durch die Verwendung transgener Mäuse. Die protektive Wirkung von SLPI könnte aber auch belegt werden, indem die Funktion von SLPI im Rahmen der EAE inhibiert oder supprimiert würde. Dafür käme eine Behandlung von Tieren mit SLPI-Antikörpern oder die EAE-Induktion in SLPI defizienten Knock-out-Mäusen (Nakamura et al., 2003) in Frage. Falls die Inhibition von SLPI gelingen sollte, wäre eine Verschlechterung der EAE-Symptome in der Folge zu erwarten.

Die Rolle von Kininen in der EAE

Die mRNA für T-Kininogen war während der akuten Phase aufreguliert – wahrscheinlich induziert durch die starke Entzündung während der EAE. Beim T-Kininogen handelt es sich um ein Vorläuferprotein von Kininen, das durch die Aktivität von Serin-Proteinasen, aber nicht von den Kallikreinen, die andere Kininogene aktivieren, so gespalten wird, dass das aktive Nonapeptid Bradykinin dabei entsteht (Okamoto and Greenbaum, 1983). Die funktionelle Bedeutung dieses Systems wurde in der vorliegenden Studie anhand der adoptiven Transfer-EAE von SJL/J Mäusen durch die *in vivo* Blockade seiner Rezeptoren, dem Bradykinin-Rezeptor 2 (B₂) mit dem Inhibitor LF 16-0687 Ms (Fournier Pharma, Frankreich) bzw. dem Bradykinin-Rezeptor 1 (B₁) mit (Des-Arg⁹,Leu⁸)-Bk untersucht.

Der B₂-Inhibitor beruht nicht auf einer Peptid-Basis und ist in der Lage, auch durch eine intakte Bluthirnschranke zu diffundieren, was seine Anwendung im Rahmen der EAE sehr vielversprechend erscheinen lässt, da der B₂-Rezeptor auf Zellen im ZNS generell exprimiert ist, und der Inhibitor dort auch bei einer intakten Bluthirnschranke wirken kann.

Durch den B₂-Rezeptor wird die Mehrzahl der Effekte der Kinine vermittelt, und dessen Inhibition hatte bereits eine Besserung klinischen Verlaufs eines Ischämie-Modells zur Folge (Ding-Zhou et al., 2003). Kinin-Effekte, die durch den B₂-Rezeptor vermittelt werden und zur Pathologie der EAE beitragen könnten, sind eine vermehrte Produktion von proinflammatorischen Mediatoren wie z.B. reaktive Sauerstoffintermediate, Stickstoffmonoxid oder TNFα sowie die Permeabilisierung der Bluthirnschranke, wodurch die Infiltration von Effektorzellen in das ZNS gesteigert werden kann. Zudem ist der B₂-

Rezeptor auf Neutrophilen exprimiert und fördert nach Stimulierung durch Bradykinin deren Migration – wahrscheinlich u.a. dadurch bedingt, dass Selektine aktiviert werden, da der nicht selektive Selektin-Inhibitor *Fucoidin* die durch Bradykinin stimulierte Migration von Neutrophilen reduziert (Santos et al., 2003). Neutrophile werden in verschiedenen EAE-Modellen abhängig von der Ausprägung der Entzündung in geringer Zahl im ZNS gefunden. In bestimmten Formen der EAE wandern sie aber in größerem Umfang in das ZNS und initiieren dort sogar die Entzündungsreaktionen, wie z.B. bei BALB/c-Mäusen (Nygardas et al., 2000) oder der MOG-Peptid (AS 92-106) induzierten EAE von A.SW-Mäusen (Tsunoda et al., 2000) sowie in besonders akut verlaufenden Ausprägungen der MS. Aus diesem Grund kann die chemotaktische Wirkung von Kininen auf Neutrophile im Rahmen der EAE zumindest nicht komplett vernachlässigt werden.

Die Anwendung des B₂-Inhibitors begann direkt zum Zeitpunkt der Induktion der passiven EAE und wurde bis einschließlich des neunten Tages zweimal am Tag durchgeführt. Ab dem zehnten bis zum sechzehnten Tag wurde LF 16-0687 Ms nur noch einmal pro Tag injiziert. 30 Mäuse wurden, eingeteilt in drei Gruppen, behandelt. Eine Gruppe erhielt bei jeder Injektion 5mg/kg Körpergewicht des Inhibitors, eine weitere 2,5mg/kg Körpergewicht. Einer dritten Gruppe mit LF 16-0687 Ms behandelten Tiere wiesen einen milderen EAE-Verlauf als die Kontrolltiere auf. Dabei waren die Unterschiede zwischen der Gruppe, die 5mg/kg des Inhibitors pro Injektion bekommen hatte, und der Kontrollgruppe an den Tagen 15 und 16 signifikant. Nach dem Absetzen des Inhibitors näherten sich allerdings die durchschnittlichen EAE-Verläufe der drei Gruppen wieder an und waren am 22. Tag gleich. Dies deutet darauf hin, dass vor allem kurzfristige vom B₂-Rezeptor vermittelte Effekte durch die Gabe des Inhibitors LF 16-0687 Ms inhibiert werden konnten. Es scheint also, dass eher Effektormechanismen beeinflusst werden als Mechanismen, die bei der Initiierung der Krankheit von Bedeutung sind. Dafür spricht auch, dass die Inzidenz der Erkrankung gar nicht und der Krankheitsbeginn kaum verändert waren. Dies wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass der Inhibitor die Proliferation von enzephalitogenen T-Zellen nicht maßgeblich beeinflussen konnte – also zumindest nicht toxisch wirkt. In einem Zusatzexperiment, in dem der B₂-Inhibitor für vier Tage ab dem 6. Tag nach EAE-Induktion injiziert wurde, konnte die durch die EAE verursachte Induktion der B₁-Rezeptor-mRNA in den Lymphknoten reduziert werden. Die Aktivierung des B₂-Rezeptors hat u.a. die Induktion der B₁-Expression zur Folge (Souza et al., 2004). Die Reduktion der B₁-Rezeptor-mRNA stellt einen messbaren Beleg für die Effektivität der Applikation von LF 16-0687 Ms dar.

Es konnte also in einem ersten Versuch belegt werden, dass Kinine in der EAE zumindest zu Beginn einen krankheitsverstärkenden Effekt haben, weil die Inhibition eines der beiden maßgeblichen Rezeptoren zu einer Abnahme der klinischen Symptomatik führte. Die protektiven Eigenschaften des Inhibitors müssten in weiteren Versuchen untersucht werden, in denen der Inhibitor über einen längeren Zeitraum und/oder erst ab dem Krankheitsbeginn verabreicht wird.

Der B₁-Rezeptor wird u.a. auf T-Zellen nur nach Induktion durch inflammatorische Stimuli wie IFN γ oder TNF α produziert. Patienten mit einer sekundär, progressiven Form der MS weisen in ihren T-Zellen eine deutlich erhöhte Expression des B₁-Rezeptors auf – ebenso Patienten, deren Krankheit einen schubförmig, remittierenden Verlauf hat, während eines Schubes. Aus *in vitro*-Assays ist bekannt, dass der B₁-Agonist *Sar (D-Phe⁸) des Arg⁹-BK* eine verstärkte Migration von T-Zellen von MS-Patienten verhindert, woraus zu schliessen ist, dass der B₁-Rezeptor Signale übermittelt, die zu einer Inhibition der T-Zellmigration führen (Prat et al., 1999). Er ist aber auch induzierbar auf zerebralen Endothelzellen exprimiert und kann die Permeabilisierung der Bluthirnschranken fördern (Prat et al., 2000). Die Injektion des B₁-Inhibitors (Des-Arg⁹,Leu⁸)-Bk führte zu einer leichten, aber nicht signifikanten Verbesserung der Krankheitssymptome während der AT-EAE.

Auch wenn der B₁-Rezeptor im Rückenmark innerhalb der MOG induzierten EAE der DA-Ratte nicht aufreguliert ist, sollte neben der Fortführung der Versuche mit dem B₂-Rezeptor Inhibitor auch weitere Versuche mit Inhibitoren für B₁ durchgeführt werden. Der verwendete B₁-Inhibitor ist ein Peptid und ist deshalb weniger gut *in vivo* einsetzbar, da er schnell proteolytisch abgebaut werden kann und nicht durch die intakte Bluthirnschranke gelangt. Es wäre wünschenswert einen Inhibitor zur Verfügung zu haben, der nicht peptidbasiert ist und wenn möglich auch durch eine intakte Bluthirnschranke diffundieren kann wie der verwendete B₂-Inhibitor LF 16-0687 Ms.

Zusammenfassung

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine T-Zell-vermittelte, entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des ZNS. Die EAE hat viele Ähnlichkeiten zur MS, wie z.B. den chronisch-relapsierenden klinischen Verlauf, das Auftreten von Entzündungen, Demyelinisierung, axonaler Schädigung und reaktiver Gliose und gilt deshalb als ihr Tiermodell. Sie wird häufig zur Identifizierung bzw. Erprobung neuer, experimenteller Therapieverfahren herangezogen. In der vorliegenden Studie wurden im Rahmen von Untersuchungen in EAE-Modellen zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt, die zum besseren Verständnis pathogenetischer Prozesse bei autoimmun vermittelter ZNS-Entzündung und zur Identifikation therapeutischer Zielmoleküle führen sollten.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Rolle des TNF-Familienmitglied TWEAK bzw. seines Rezeptors Fn14 in der Pathogenese der EAE untersucht. Die Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von TWEAK bzw. gegen Fn14 führte in zwei Tiermodellen, der MOG-induzierten EAE von DA-Ratten sowie der PLP-Peptid-induzierten EAE von SJL/J-Mäusen zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Krankheitsverlaufs. Die Verbesserung der Krankheitssymptome ging einher mit einer deutlichen Verminderung inflammatorischer Infiltrate im Rückenmark. Es wurde gezeigt, dass TWEAK in zerebralen Endothelzellen bzw. Astrozyten die Sekretion des Chemokins CCL2 verstärkt bzw. induziert. Sowohl TWEAK- als auch Fn14-spezifische Antikörper verhinderten diese Freisetzung. Die Blockade der TWEAK-vermittelten Chemokinfreisetzung wird daher als wesentlicher Mechanismus neutralisierender TWEAK- bzw. Fn14-Antikörper angesehen.

Im Gegensatz dazu führte die intramuskuläre Injektion eines für das TWEAK-Protein kodierenden DNA-Konstrukts sowohl zu einer Verstärkung der Erkrankung als auch zu einer verstärkten T-Zell-Infiltration ins Rückenmark. Die Expression und Sekretion von TWEAK konnte als mögliche Ursache dieses krankheitsverstärkenden Effekts identifiziert werden.

Das zweite Teilprojekt bestand aus einer umfangreichen Genexpressionsstudie im ZNS bei der MOG-induzierten EAE. Dabei wurde mit der Hilfe der DNA-Array-Technologie die Genexpression im Rückenmark während der akuten Phase der Ratten-EAE, der Remission sowie der relapsierenden Phase der EAE mit derjenigen gesunder Tiere verglichen. Die Expression ausgewählter regulierter Gene wurde mittels RealTime-PCR und z.T. WesternBlots überprüft. Die Ergebnisse der Mikroarrays konnten durch diese Verfahren bestätigt werden.

In den unterschiedlichen Phasen waren ca. 1000 Transkripte herauf- und eine ähnliche Anzahl herunterreguliert. Das Ergebnis dieser Studie deckte sich in vielen Aspekten mit den Ergebnissen bereits publizierter Studien, in denen andere EAE-Modelle auf eine ähnliche Art und Weise untersucht wurden. Allerdings gab es auch bemerkenswerte Unterschiede. Während z.B. in der hier untersuchten MOG-induzierten EAE von DA-Ratten die Gene ZNS residenter Zellen in der akuten Phase eher herunterreguliert waren, waren sie in der C57Bl/6-Maus zum großen Teil stark aufreguliert, was für eine verstärkte Beeinträchtigung neuronaler Funktionen oder eine ausgeprägtere Schädigung neuronalen Gewebes während der EAE der DA-Ratte spricht.

Die erhöhte Expression von Genen, die spezifisch für dendritische Zellen sind, belegt deren Anwesenheit im entzündeten Rückenmark. Die Funktion dieser Zellen für die Entstehung und Aufrechterhaltung der ZNS-Entzündung ist derzeit noch unklar. Die anhaltende Suppression der Gene des Cholesterin-Anabolismus weist auf eine bislang nicht publizierte Störung des Cholesterinstoffwechsels innerhalb des ZNS während der EAE hin.

Im Rahmen der Expressionsanalyse konnten verschiedene potentielle Zielmoleküle identifiziert werden, wie z.B. BAFF, CXCL13 oder SLPI, und eine krankheitsverstärkende Rolle der Kinine in der EAE konnte durch die *in vivo*-Applikation von Inhibitoren für seine beiden Rezeptoren bereits bestätigt werden.

Während also im ersten Teil der Doktorarbeit die Rolle des TNF-Familienmitglieds TWEAK und seines Rezeptors Fn14 gezielt analysiert wurde, ergaben sich im Rahmen der Expressionsanalyse im zweiten Teil neue potentielle Angriffspunkte für die Therapie entzündlicher ZNS-Erkrankungen.

Anhang

Abkürzungen

APC	Antigen-präsentierende Zellen
AT-EAE	Adoptive Transfer-EAE
BAFF	B cell activating factor
BK	Bradykinin
CCL2	Monocyte-chemoattractant-protein-1
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvant
DC	Dendritische Zelle
DD	Death Domain (Todesdomäne)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EST	Expressed Sequence Tag
FasL	Fas Ligand
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA
i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFA	inkomplettes Freund'sches Adjuvans
IFN γ	Interferon- γ
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
IRF-1	Interferon regulatory factor-1
kDa	Kilodalton
LNC	Lymphknotenzellen
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	LDL receptor-related Protein
LT α	Lymphotoxin- α
LT β R	Lymphotoxin- β Rezeptor
M Φ	Makrophagen

MAG	Myelin-associated glycoprotein
MBP	Myelin basic protein
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOBP	Myelin-associated oligodendrocytic basic Protein
MOG	Myelin oligodendrocytic glycoprotein
NF- κ B	Nuclear factor of κ light chain gene enhancer in B cells-1
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Nitric oxide synthase
OMG	Oligodendrocyte myelin glycoprotein
OPC	oligodendrogliale Vorläuferzelle
PCA	Principal component analysis
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid Protein
RANTES	Regulated upon activation, normally T-expressed, and presumably secreted (CCL5)
rFn14	Ratten Fn14-Protein
RM	Rückenmark
rMOG	Ratten MOG, AS 1-125
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rTWEAKext	Externe Domäne des Ratten TWEAK-Protein
s.c.	subkutan
SLPI	Secretory leukocyte protease inhibitor
SOM-Analyse	Self Organizing Map-Analyse
SRE	Sterol regulatory element
TGF β	Transforming growth factor β
TNF α	Tumor Nekrose Faktor- α
TNFSF	Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie
TR6	TNF Rezeptor Superfamilien-Mitglied 6 (\equiv DcR3)
TRADD	TNF-R1-Associated Death Domain
TRAF	TNF-Receptor-Associated-Factor
Trail	TNF-related apoptosis inducing ligand
ZNS	Zentrales Nervensystem

Referenzen

- Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Packman, J.N., Hurwitz, A., Payne, D.W., 1990. *Cytokine-mediated regulation of ovarian function: tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin-supported progesterone accumulation by differentiating and luteinized murine granulosa cells*. Am J Obstet Gynecol 162, 889-896; discussion 896-889.
- Adelmann, M., Wood, J., Benzel, I., Fiori, P., Lassmann, H., Matthieu, J.M., Gardinier, M.V., Dornmair, K., Linington, C., 1995. *The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat*. J Neuroimmunol 63, 17-27.
- Aggarwal, B.B., 2003. *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol 3, 745-756.
- Ahn, J.H., Lee, Y., Jeon, C., Lee, S.J., Lee, B.H., Choi, K.D., Bae, Y.S., 2002. *Identification of the genes differentially expressed in human dendritic cell subsets by cDNA subtraction and microarray analysis*. Blood 100, 1742-1754.
- Akum, B.F., Chen, M., Gunderson, S.I., Riefler, G.M., Scerri-Hansen, M.M., Firestein, B.L., 2004. *Cypin regulates dendrite patterning in hippocampal neurons by promoting microtubule assembly*. Nat Neurosci 7, 145-152.
- Amor, S., Groome, N., Linington, C., Morris, M.M., Dornmair, K., Gardinier, M.V., Matthieu, J.M., Baker, D., 1994. *Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice*. J Immunol 153, 4349-4356.
- Armitage, R.J., 1994. *Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands*. Curr Opin Immunol 6, 407-413.
- Asher, R.A., Morgenstern, D.A., Shearer, M.C., Adcock, K.H., Pesheva, P., Fawcett, J.W., 2002. *Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells*. J Neurosci 22, 2225-2236.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. *Death receptors: signaling and modulation*. Science 281, 1305-1308.
- Bachmann, R., Eugster, H.P., Frei, K., Fontana, A., Lassmann, H., 1999. *Impairment of TNF-receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice*. Am J Pathol 154, 1417-1422.
- Baker, D., Rosenwasser, O.A., O'Neill, J.K., Turk, J.L., 1995. *Genetic analysis of experimental allergic encephalomyelitis in mice*. J Immunol 155, 4046-4051.
- Balabanian, K., Couderc, J., Bouchet-Delbos, L., Amara, A., Berrebi, D., Foussat, A., Baleux, F., Portier, A., Durand-Gasselin, I., Coffman, R.L., Galanaud, P., Peuchmaur, M., Emilie, D., 2003. *Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus*. J Immunol 170, 3392-3400.
- Bates, E.E., Dieu, M.C., Ravel, O., Zurawski, S.M., Patel, S., Bridon, J.M., Ait-Yahia, S., Vega, F., Jr., Banchereau, J., Lebecque, S., 1998. *CD40L activation of dendritic cells down-regulates DORA, a novel member of the immunoglobulin superfamily*. Mol Immunol 35, 513-524.
- Baud, V., Karin, M., 2001. *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol 11, 372-377.
- Baulieu, E.E., Robel, P., Schumacher, M., 2001. *Neurosteroids: beginning of the story*. Int Rev Neurobiol 46, 1-32.

- Bechmann, I., Steiner, B., Gimsa, U., Mor, G., Wolf, S., Beyer, M., Nitsch, R., Zipp, F., 2002. Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent. *J Neuroimmunol* 132, 60-65.
- Beck, R.W., Cleary, P.A., Trobe, J.D., Kaufman, D.I., Kupersmith, M.J., Paty, D.W., Brown, C.H., 1993. The effect of corticosteroids for acute optic neuritis on the subsequent development of multiple sclerosis. *The Optic Neuritis Study Group. N Engl J Med* 329, 1764-1769.
- Ben-Nun, A., Wekerle, H., Cohen, I.R., 1981. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 11, 195-199.
- Bignami, A., Perides, G., Rahemtulla, F., 1993. Versican, a hyaluronate-binding proteoglycan of embryonal precartilaginous mesenchyma, is mainly expressed postnatally in rat brain. *J Neurosci Res* 34, 97-106.
- Bjorkhem, I., Meaney, S., 2004. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 806-815.
- Bonetti, B., Pohl, J., Gao, Y.L., Raine, C.S., 1997. Cell death during autoimmune demyelination: effector but not target cells are eliminated by apoptosis. *J Immunol* 159, 5733-5741.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brewer, J.M., Conacher, M., Hunter, C.A., Mohrs, M., Brombacher, F., Alexander, J., 1999. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol* 163, 6448-6454.
- Brouwer, N., Zuurman, M.W., Wei, T., Ransohoff, R.M., Boddeke, H.W., Biber, K., 2004. Induction of glial L-CCR mRNA expression in spinal cord and brain in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 46, 84-94.
- Brown, S.A., Richards, C.M., Hanscom, H.N., Feng, S.L., Winkles, J.A., 2003. The Fn14 cytoplasmic tail binds tumour-necrosis-factor-receptor-associated factors 1, 2, 3 and 5 and mediates nuclear factor-kappaB activation. *Biochem J* 371, 395-403.
- Bruck, W., Porada, P., Poser, S., Rieckmann, P., Hanefeld, F., Kretzschmar, H.A., Lassmann, H., 1995. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 38, 788-796.
- Carmody, R.J., Hilliard, B., Maguschak, K., Chodosh, L.A., Chen, Y.H., 2002. Genomic scale profiling of autoimmune inflammation in the central nervous system: the nervous response to inflammation. *J Neuroimmunol* 133, 95-107.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.
- Chabas, D., Baranzini, S.E., Mitchell, D., Bernard, C.C., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Sobel, R.A., Lock, C., Karpud, M., Pedotti, R., Heller, R., Oksenberg, J.R., Steinman, L., 2001. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294, 1731-1735.
- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J., 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.
- Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Chastain, M., Simon, A.J., Soper, K.A., Holder, D.J., Montgomery, D.L., Sagar, S.L., Casimiro, D.R., Middaugh, C.R., 2001. Antigen levels and antibody titers after DNA vaccination. *J Pharm Sci* 90, 474-484.

- Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., Browning, J.L., 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272, 32401-32410.
- Chicheportiche, Y., Chicheportiche, R., Sizing, I., Thompson, J., Benjamin, C.B., Ambrose, C., Dayer, J.M., 2002. Proinflammatory activity of TWEAK on human dermal fibroblasts and synoviocytes: blocking and enhancing effects of anti-TWEAK monoclonal antibodies. *Arthritis Res* 4, 126-133.
- Clementi, E., Brown, G.C., Foxwell, N., Moncada, S., 1999. On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1559-1562.
- Clements, J.A., Willemsen, N.M., Myers, S.A., Dong, Y., 2004. The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41, 265-312.
- Colbran, R.J., 2004. Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 378, 1-16.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J., Smyth, M.J., 2002. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168, 1356-1361.
- Dawson, M.R., Polito, A., Levine, J.M., Reynolds, R., 2003. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 24, 476-488.
- De Ketelaere, A., Vermeulen, L., Vialard, J., Van De Weyer, I., Van Wauwe, J., Haegeman, G., Moelans, I., 2004. Involvement of GSK-3beta in TWEAK-mediated NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 566, 60-64.
- Derfuss, T., Hohlfeld, R., Meinl, E., 2001. [Multiple sclerosis. Chlamydia hypothesis in debate]. *Nervenarzt* 72, 820-823.
- Desplat-Jego, S., Varriale, S., Creidy, R., Terra, R., Bernard, D., Khrestchatsky, M., Izui, S., Chicheportiche, Y., Boucraut, J., 2002. TWEAK is expressed by glial cells, induces astrocyte proliferation and increases EAE severity. *J Neuroimmunol* 133, 116-123.
- Di Bello, I.C., Dawson, M.R., Levine, J.M., Reynolds, R., 1999. Generation of oligodendroglial progenitors in acute inflammatory demyelinating lesions of the rat brain stem is associated with demyelination rather than inflammation. *J Neurocytol* 28, 365-381.
- Di Rosa, F., Francesconi, A., Di Virgilio, A., Finocchi, L., Santilio, I., Barnaba, V., 1998. Lack of Th2 cytokine increase during spontaneous remission of experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 28, 3893-3903.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., 2004. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res*.
- Ding-Zhou, L., Margaill, I., Palmier, B., Pruneau, D., Plotkine, M., Marchand-Verrecchia, C., 2003. LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces ischemic brain injury in a murine model of transient focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol* 139, 1539-1547.
- Dittel, B.N., Merchant, R.M., Janeway, C.A., Jr., 1999. Evidence for Fas-dependent and Fas-independent mechanisms in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 162, 6392-6400.
- Donnelly, J., Berry, K., Ulmer, J.B., 2003. Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *Int J Parasitol* 33, 457-467.
- Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W., Liu, M.A., 1997. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 15, 617-648.

- Dou, D., Joseph, R., 1996. Cloning of human neuronatin gene and its localization to chromosome-20q 11.2-12: the deduced protein is a novel "proteolipid". Brain Res 723, 8-22.*
- Dowling, P., Husar, W., Menonna, J., Donnenfeld, H., Cook, S., Sidhu, M., 1997. Cell death and birth in multiple sclerosis brain. J Neurol Sci 149, 1-11.*
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X., 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell 102, 33-42.*
- Erhardt, J.A., Hynicka, W., DiBenedetto, A., Shen, N., Stone, N., Paulson, H., Pittman, R.N., 1998. A novel F box protein, NFB42, is highly enriched in neurons and induces growth arrest. J Biol Chem 273, 35222-35227.*
- Esiri, M.M., 1977. Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. Lancet 2, 478.*
- Ewen, M.E., Oliver, C.J., Sluss, H.K., Miller, S.J., Peepoer, D.S., 1995. p53-dependent repression of CDK4 translation in TGF-beta-induced G1 cell-cycle arrest. Genes Dev 9, 204-217.*
- Ferguson, B., Matyszak, M.K., Esiri, M.M., Perry, V.H., 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. Brain 120 (Pt 3), 393-399.*
- Fife, B.T., Huffnagle, G.B., Kuziel, W.A., Karpus, W.J., 2000. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med 192, 899-905.*
- Genain, C.P., Cannella, B., Hauser, S.L., Raine, C.S., 1999. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. Nat Med 5, 170-175.*
- Genain, C.P., Nguyen, M.H., Letvin, N.L., Pearl, R., Davis, R.L., Adelman, M., Lees, M.B., Linington, C., Hauser, S.L., 1995. Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. J Clin Invest 96, 2966-2974.*
- Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B., 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol 16, 225-260.*
- Glabinski, A.R., Tani, M., Tuohy, V.K., Tuthill, R.J., Ransohoff, R.M., 1995. Central nervous system chemokine mRNA accumulation follows initial leukocyte entry at the onset of acute murine experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Behav Immun 9, 315-330.*
- Gold, R., Hartung, H.P., Lassmann, H., 1997. T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms. Trends Neurosci 20, 399-404.*
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1990. Regulation of the mevalonate pathway. Nature 343, 425-430.*
- Gommerman, J.L., Giza, K., Perper, S., Sizing, I., Ngam-Ek, A., Nickerson-Nutter, C., Browning, J.L., 2003. A role for surface lymphotoxin in experimental autoimmune encephalomyelitis independent of LIGHT. J Clin Invest 112, 755-767.*
- Goritz, C., Mauch, D.H., Nagler, K., Pfrieger, F.W., 2002. Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair. J Physiol Paris 96, 257-263.*
- Gotte, M., 2003. Syndecans in inflammation. Faseb J 17, 575-591.*
- Graumann, U., Reynolds, R., Steck, A.J., Schaeren-Wiemers, N., 2003. Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult. Brain Pathol 13, 554-573.*
- Harada, N., Nakayama, M., Nakano, H., Fukuchi, Y., Yagita, H., Okumura, K., 2002. Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 299, 488-493.*

- Hardiman, G., 2002. Microarray technologies -- an overview. *The University of California San Diego Extension, Bioscience, Microarray Technologies -- an overview, March 13-15, 2002. Pharmacogenomics* 3, 293-297.
- Hartung, H.P., Gonsette, R., Konig, N., Kwiecinski, H., Guseo, A., Morrissey, S.P., Krapf, H., Zwingers, T., 2002. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 360, 2018-2025.
- Hemmer, B., Kieseier, B., Cepok, S., Hartung, H.P., 2003. New immunopathologic insights into multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3, 246-255.
- Hiemstra, P.S., 2002. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem Soc Trans* 30, 116-120.
- Hilliard, B., Wilmen, A., Seidel, C., Liu, T.S., Goke, R., Chen, Y., 2001. Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 166, 1314-1319.
- Hisahara, S., Okano, H., Miura, M., 2003. Caspase-mediated oligodendrocyte cell death in the pathogenesis of autoimmune demyelination. *Neurosci Res* 46, 387-397.
- Hjelmstrom, P., Juedes, A.E., Fjell, J., Ruddle, N.H., 1998. B-cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization. *J Immunol* 161, 4480-4483.
- Hoheisel, J.D., Vingron, M., 2000. Transcriptional profiling: is it worth the money? *Res Microbiol* 151, 113-119.
- Hohol, M.J., Olek, M.J., Orav, E.J., Stazzone, L., Hafler, D.A., Khouri, S.J., Dawson, D.M., Weiner, H.L., 1999. Treatment of progressive multiple sclerosis with pulse cyclophosphamide/methylprednisolone: response to therapy is linked to the duration of progressive disease. *Mult Scler* 5, 403-409.
- Honda, A., Miyoshi, K., Baba, K., Taniguchi, M., Koyama, Y., Kuroda, S., Katayama, T., Tohyama, M., 2004. Expression of fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) in the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 122, 89-92.
- Hosack, D.A., Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Lane, H.C., Lempicki, R.A., 2003. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 4, R70.
- Hosseini, H., Andre, P., Lefevre, N., Viala, L., Walzer, T., Peschanski, M., Lotteau, V., 2001. Protection against experimental autoimmune encephalomyelitis by a proteasome modulator. *J Neuroimmunol* 118, 233-244.
- Hulkower, K., Brosnan, C.F., Aquino, D.A., Cammer, W., Kulshrestha, S., Guida, M.P., Rapoport, D.A., Berman, J.W., 1993. Expression of CSF-1, c-fms, and MCP-1 in the central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 150, 2525-2533.
- Ibanez, C., Shields, S.A., El-Etr, M., Baulieu, E.E., Schumacher, M., Franklin, R.J., 2004. Systemic progesterone administration results in a partial reversal of the age-associated decline in CNS remyelination following toxin-induced demyelination in male rats. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30, 80-89.
- Ibrahim, S.M., Mix, E., Bottcher, T., Koczan, D., Gold, R., Rolfs, A., Thiesen, H.J., 2001. Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 124, 1927-1938.
- Idriss, H.T., Naismith, J.H., 2000. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50, 184-195.
- Issazadeh, S., Lorentzen, J.C., Mustafa, M.I., Hojeberg, B., Mussener, A., Olsson, T., 1996. Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *J Neuroimmunol* 69, 103-115.

- Izikson, L., Klein, R.S., Charo, I.F., Weiner, H.L., Luster, A.D., 2000. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med* 192, 1075-1080.
- Johns, L.D., Flanders, K.C., Ranges, G.E., Sriram, S., 1991. Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis with transforming growth factor-beta 1. *J Immunol* 147, 1792-1796.
- Johns, T.G., Kerlero de Rosbo, N., Menon, K.K., Abo, S., Gonzales, M.F., Bernard, C.C., 1995. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis. *J Immunol* 154, 5536-5541.
- Jones, E.Y., Stuart, D.I., Walker, N.P., 1989. Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338, 225-228.
- Juedes, A.E., Ruddle, N.H., 2001. Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 166, 5168-5175.
- Jurevics, H., Largent, C., Hostettler, J., Sammond, D.W., Matsushima, G.K., Kleindienst, A., Toews, A.D., Morell, P., 2002. Alterations in metabolism and gene expression in brain regions during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *J Neurochem* 82, 126-136.
- Kaptein, A., Jansen, M., Dilaver, G., Kitson, J., Dash, L., Wang, E., Owen, M.J., Bodmer, J.L., Tschopp, J., Farrow, S.N., 2000. Studies on the interaction between TWEAK and the death receptor WSL-1/TRAMP (DR3). *FEBS Lett* 485, 135-141.
- Karpus, W.J., Swanborg, R.H., 1991. CD4+ suppressor cells inhibit the function of effector cells of experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism involving transforming growth factor-beta. *J Immunol* 146, 1163-1168.
- Karpusas, M., Hsu, Y.M., Wang, J.H., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L., Thomas, D., 1995. 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 3, 1426.
- Kawakita, T., Shiraki, K., Yamanaka, Y., Yamaguchi, Y., Saitou, Y., Enokimura, N., Yamamoto, N., Okano, H., Sugimoto, K., Murata, K., Nakano, T., 2005. Functional expression of TWEAK in human colonic adenocarcinoma cells. *Int J Oncol* 26, 87-93.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K., Yagita, H., 1995. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 182, 1777-1783.
- Kennedy, K.J., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Lukacs, N.W., Karpus, W.J., 1998. Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemotactic protein-1. *J Neuroimmunol* 92, 98-108.
- Kennedy, M.K., Torrance, D.S., Picha, K.S., Mohler, K.M., 1992. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol* 149, 2496-2505.
- Kieseier, B.C., Hartung, H.P., 2003. Current disease-modifying therapies in multiple sclerosis. *Semin Neurol* 23, 133-146.
- Kikuchi, T., Abe, T., Yaekashiwa, M., Tominaga, Y., Mitsuhashi, H., Satoh, K., Nakamura, T., Nukiwa, T., 2000. Secretory leukoprotease inhibitor augments hepatocyte growth factor production in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 364-370.
- King, K., Moody, A., Fisher, S.A., Mirza, M.M., Cuthbert, A.P., Hampe, J., Sutherland-Craggs, A., Sanderson, J., MacPherson, A.J., Forbes, A., Mansfield, J., Schreiber, S., Lewis, C.M., Mathew, C.G., 2003. Genetic variation in the IGSF6 gene and lack of association with inflammatory bowel disease. *Eur J Immunogenet* 30, 187-190.

- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.
- Kloetzel, P.M., Ossendorp, F., 2004. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 16, 76-81.
- Kojima, K., Berger, T., Lassmann, H., Hinze-Selch, D., Zhang, Y., Gehrmann, J., Reske, K., Wekerle, H., Linington, C., 1994. Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia. *J Exp Med* 180, 817-829.
- Kornek, B., Lassmann, H., 2003. Neuropathology of multiple sclerosis-new concepts. *Brain Res Bull* 61, 321-326.
- Kornek, B., Storch, M.K., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Olsson, T., Linington, C., Schmidbauer, M., Lassmann, H., 2000. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 157, 267-276.
- Korner, H., Lemckert, F.A., Chaudhri, G., Etteldorf, S., Sedgwick, J.D., 1997. Tumor necrosis factor blockade in actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis prevents clinical disease despite activated T cell infiltration to the central nervous system. *Eur J Immunol* 27, 1973-1981.
- Kubo, T., Yamashita, T., Yamaguchi, A., Hosokawa, K., Tohyama, M., 2002. Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays. *J Neurochem* 82, 1129-1136.
- Kuruvilla, A.P., Shah, R., Hochwald, G.M., Liggitt, H.D., Palladino, M.A., Thorbecke, G.J., 1991. Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2918-2921.
- Kuznetsova, S.A., Roberts, D.D., 2004. Functional regulation of T lymphocytes by modulatory extracellular matrix proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1126-1134.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larsen, C.N., Krantz, B.A., Wilkinson, K.D., 1998. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry* 37, 3358-3368.
- Lassmann, H., 2001. Classification of demyelinating diseases at the interface between etiology and pathogenesis. *Curr Opin Neurol* 14, 253-258.
- Lebar, R., Lubetzki, C., Vincent, C., Lombrail, P., Boutry, J.M., 1986. The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin Exp Immunol* 66, 423-434.
- Lee, H.O., Levorse, J.M., Shin, M.K., 2003. The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors. *Dev Biol* 259, 162-175.
- Lentsch, A.B., Jordan, J.A., Czermak, B.J., Diehl, K.M., Younkin, E.M., Sarma, V., Ward, P.A., 1999. Inhibition of NF-kappaB activation and augmentation of IkappaBbeta by secretory leukocyte protease inhibitor during lung inflammation. *Am J Pathol* 154, 239-247.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J., 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Liao, J.K., 2002. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest* 110, 285-288.
- Lie, D.C., Song, H., Colamarino, S.A., Ming, G.L., Gage, F.H., 2004. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 399-421.

- Lieb, K., Engels, S., Fiebich, B.L., 2003. Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells. Neurochem Int 42, 131-137.*
- Lin, K.F., Chang, R.C., Suen, K.C., So, K.F., Hugon, J., 2004. Modulation of calcium/calmodulin kinase-II provides partial neuroprotection against beta-amyloid peptide toxicity. Eur J Neurosci 19, 2047-2055.*
- Linington, C., Berger, T., Perry, L., Weerth, S., Hinze-Selch, D., Zhang, Y., Lu, H.C., Lassmann, H., Wekerle, H., 1993. T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. Eur J Immunol 23, 1364-1372.*
- Linington, C., Engelhardt, B., Kapocs, G., Lassman, H., 1992. Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. J Neuroimmunol 40, 219-224.*
- Linington, C., Lassmann, H., 1987. Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). J Neuroimmunol 17, 61-69.*
- Liu, J., Marino, M.W., Wong, G., Grail, D., Dunn, A., Bettadapura, J., Slavin, A.J., Old, L., Bernard, C.C., 1998. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. Nat Med 4, 78-83.*
- Lobell, A., Weissert, R., Storch, M.K., Svanholm, C., de Graaf, K.L., Lassmann, H., Andersson, R., Olsson, T., Wigzell, H., 1998. Vaccination with DNA encoding an immunodominant myelin basic protein peptide targeted to Fc of immunoglobulin G suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med 187, 1543-1548.*
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Austin, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S.J., Oksenberg, J.R., Raine, C.S., Heller, R., Steinman, L., 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. Nat Med 8, 500-508.*
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell 104, 487-501.*
- Loeffler, M., Kroemer, G., 2000. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. Exp Cell Res 256, 19-26.*
- Lolli, F., Siracusa, G., Amato, M.P., Fratiglioni, L., Dal Pozzo, G., Galli, E., Amaducci, L., 1991. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains and IgM in initial multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 83, 239-243.*
- Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J., Kroemer, G., 1999. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. Cell Death Differ 6, 516-524.*
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol 47, 707-717.*
- Lukic, M.L., Mensah-Brown, E., Galadari, S., Shahin, A., 2001. Lack of apoptosis of infiltrating cells as the mechanism of high susceptibility to EAE in DA rats. Dev Immunol 8, 193-200.*
- Lunemann, J.D., Waiczies, S., Ehrlich, S., Wendling, U., Seeger, B., Kamradt, T., Zipp, F., 2002. Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells. J Immunol 168, 4881-4888.*
- Lutjohann, D., Stroick, M., Bertsch, T., Kuhl, S., Lindenthal, B., Thelen, K., Andersson, U., Bjorkhem, I., Bergmann Kv, K., Fassbender, K., 2004. High doses of simvastatin, pravastatin, and cholesterol reduce brain cholesterol synthesis in guinea pigs. Steroids 69, 431-438.*

- Lynch, C.N., Wang, Y.C., Lund, J.K., Chen, Y.W., Leal, J.A., Wiley, S.R., 1999. *TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells*. *J Biol Chem* 274, 8455-8459.
- Mackay, F., Woodcock, S.A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J.L., 1999. *Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations*. *J Exp Med* 190, 1697-1710.
- Maglizzi, R., Columba-Cabezas, S., Serafini, B., Aloisi, F., 2004. *Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neuroimmunol* 148, 11-23.
- Mahad, D.J., Ransohoff, R.M., 2003. *The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)*. *Semin Immunol* 15, 23-32.
- Mancardi, G.L., Sardanelli, F., Parodi, R.C., Melani, E., Capello, E., Inglese, M., Ferrari, A., Sormani, M.P., Ottonello, C., Levrero, F., Uccelli, A., Bruzzi, P., 1998. *Effect of copolymer-1 on serial gadolinium-enhanced MRI in relapsing remitting multiple sclerosis*. *Neurology* 50, 1127-1133.
- Maniatis, T., 1997. *Catalysis by a multiprotein IkappaB kinase complex*. *Science* 278, 818-819.
- Martin, R., McFarland, H.F., 1995. *Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis*. *Crit Rev Clin Lab Sci* 32, 121-182.
- Martino, G., 2004. *How the brain repairs itself: new therapeutic strategies in inflammatory and degenerative CNS disorders*. *Lancet Neurol* 3, 372-378.
- Matejuk, A., Hopke, C., Dwyer, J., Subramanian, S., Jones, R.E., Bourdette, D.N., Vandenbark, A.A., Offner, H., 2003. *CNS gene expression pattern associated with spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neurosci Res* 73, 667-678.
- Mathey, E., Breithaupt, C., Schubart, A.S., Linington, C., 2004. *Commentary: Sorting the wheat from the chaff: identifying demyelinating components of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific autoantibody repertoire*. *Eur J Immunol* 34, 2065-2071.
- Matsunami, H., Takeichi, M., 1995. *Fetal brain subdivisions defined by R- and E-cadherin expressions: evidence for the role of cadherin activity in region-specific, cell-cell adhesion*. *Dev Biol* 172, 466-478.
- Matyszak, M.K., Perry, V.H., 1996. *The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system*. *Neuroscience* 74, 599-608.
- Mauch, D.H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E.C., Otto, A., Pfrieger, F.W., 2001. *CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol*. *Science* 294, 1354-1357.
- Meighan-Mantha, R.L., Hsu, D.K., Guo, Y., Brown, S.A., Feng, S.L., Peifley, K.A., Alberts, G.F., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Richards, C.M., Winkles, J.A., 1999. *The mitogen-inducible Fn14 gene encodes a type I transmembrane protein that modulates fibroblast adhesion and migration*. *J Biol Chem* 274, 33166-33176.
- Miller, S.D., Shevach, E.M., 1998. *Immunoregulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: editorial overview*. *Res Immunol* 149, 753-759.
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., Miyazono, K., 2002. *Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling*. *Genes Cells* 7, 1191-1204.
- Mo, J.S., Anderson, M.G., Gregory, M., Smith, R.S., Savinova, O.V., Serreze, D.V., Ksander, B.R., Streilein, J.W., John, S.W., 2003. *By altering ocular immune privilege, bone marrow-derived cells pathogenically contribute to DBA/2J pigmentary glaucoma*. *J Exp Med* 197, 1335-1344.

- Montgomery, D.L., Donnelly, J.J., Shiver, J.W., Liu, M.A., Ulmer, J.B., 1994. Protein expression in vivo by injection of polynucleotides. Curr Opin Biotechnol 5, 505-510.*
- Moreau, T., Gutman, N., Faucher, D., Gauthier, F., 1989. Limited proteolysis of T-kininogen (thiostatin). Release of comparable fragments by different endopeptidases. J Biol Chem 264, 4298-4303.*
- Morel, Y., Schiano de Colella, J.M., Harrop, J., Deen, K.C., Holmes, S.D., Wattam, T.A., Khandekar, S.S., Truneh, A., Sweet, R.W., Gastaut, J.A., Olive, D., Costello, R.T., 2000. Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. J Immunol 165, 4397-4404.*
- Muse, E.D., Jurevics, H., Toews, A.D., Matsushima, G.K., Morell, P., 2001. Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain. J Neurochem 76, 77-86.*
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Dixit, V.M., 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. J Biol Chem 273, 2926-2930.*
- Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor. Cell 88, 355-365.*
- Nagata, S., Golstein, P., 1995. The Fas death factor. Science 267, 1449-1456.*
- Nakamura, A., Mori, Y., Hagiwara, K., Suzuki, T., Sakakibara, T., Kikuchi, T., Igarashi, T., Ebina, M., Abe, T., Miyazaki, J., Takai, T., Nukiwa, T., 2003. Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice. J Exp Med 197, 669-674.*
- Nakayama, M., Ishidoh, K., Kojima, Y., Harada, N., Kominami, E., Okumura, K., Yagita, H., 2003. Fibroblast growth factor-inducible 14 mediates multiple pathways of TWEAK-induced cell death. J Immunol 170, 341-348.*
- Nakayama, M., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Okumura, K., Yagita, H., 2000. Involvement of TWEAK in interferon gamma-stimulated monocyte cytotoxicity. J Exp Med 192, 1373-1380.*
- Nanki, T., Hayashida, K., El-Gabalawy, H.S., Suson, S., Shi, K., Girschick, H.J., Yavuz, S., Lipsky, P.E., 2000. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. J Immunol 165, 6590-6598.*
- Ndhlovu, L.C., Ishii, N., Murata, K., Sato, T., Sugamura, K., 2001. Critical involvement of OX40 ligand signals in the T cell priming events during experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 167, 2991-2999.*
- Nicot, A., Ratnakar, P.V., Ron, Y., Chen, C.C., Elkabes, S., 2003. Regulation of gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis indicates early neuronal dysfunction. Brain 126, 398-412.*
- Nohara, C., Akiba, H., Nakajima, A., Inoue, A., Koh, C.S., Ohshima, H., Yagita, H., Mizuno, Y., Okumura, K., 2001. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: a critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. J Immunol 166, 2108-2115.*
- Noseworthy, J.H., Gold, R., Hartung, H.P., 1999. Treatment of multiple sclerosis: recent trials and future perspectives. Curr Opin Neurol 12, 279-293.*
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. N Engl J Med 343, 938-952.*
- Nygardas, P.T., Maatta, J.A., Hinkkanen, A.E., 2000. Chemokine expression by central nervous system resident cells and infiltrating neutrophils during experimental autoimmune encephalomyelitis in the BALB/c mouse. Eur J Immunol 30, 1911-1918.*
- Ohtsuki, S., Watanabe, Y., Hori, S., Suzuki, H., Bhongsatiern, J., Fujiyoshi, M., Kamoi, M., Kamiya, N., Takanaga, H., Terasaki, T., 2004. mRNA expression of the ATP-binding*

- cassette transporter subfamily A (ABCA) in rat and human brain capillary endothelial cells. Biol Pharm Bull 27, 1437-1440.*
- Okamoto, H., Greenbaum, L.M., 1983. Kininogen substrates for trypsin and cathepsin D in human, rabbit and rat plasmas. Life Sci 32, 2007-2013.*
- Oksenberg, J.R., Barcellos, L.F., 2000. The complex genetic aetiology of multiple sclerosis. J Neurovirol 6 Suppl 2, S10-14.*
- Paglinawan, R., Malipiero, U., Schlapbach, R., Frei, K., Reith, W., Fontana, A., 2003. TGF β directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes. Glia 44, 219-231.*
- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M.G., Di Leve, G., Signore, A., Ruberti, G., 1999. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. J Biol Chem 274, 38241-38250.*
- Pender, M.P., Nguyen, K.B., McCombe, P.A., Kerr, J.F., 1991. Apoptosis in the nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. J Neurol Sci 104, 81-87.*
- Petersen, T.R., Bettelli, E., Sidney, J., Sette, A., Kuchroo, V., Backstrom, B.T., 2004. Characterization of MHC- and TCR-binding residues of the myelin oligodendrocyte glycoprotein 38-51 peptide. Eur J Immunol 34, 165-173.*
- Pfrieger, F.W., 2003. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. Cell Mol Life Sci 60, 1158-1171.*
- Phillips, R., Ager, A., 2002. Activation of pertussis toxin-sensitive CXCL12 (SDF-1) receptors mediates transendothelial migration of T lymphocytes across lymph node high endothelial cells. Eur J Immunol 32, 837-847.*
- Polek, T.C., Talpaz, M., Darnay, B.G., Spivak-Kroizman, T., 2003. TWEAK mediates signal transduction and differentiation of RAW264.7 cells in the absence of Fn14/TweakR. Evidence for a second TWEAK receptor. J Biol Chem 278, 32317-32323.*
- Potrovita, I., Zhang, W., Burkly, L., Hahm, K., Lincecum, J., Wang, M.Z., Maurer, M.H., Rossner, M., Schneider, A., Schwaninger, M., 2004. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis-induced neurodegeneration. J Neurosci 24, 8237-8244.*
- Powell, M.B., Mitchell, D., Lederman, J., Buckmeier, J., Zamvil, S.S., Graham, M., Ruddle, N.H., Steinman, L., 1990. Lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha production by myelin basic protein-specific T cell clones correlates with encephalitogenicity. Int Immunol 2, 539-544.*
- Prat, A., Weinrib, L., Becher, B., Poirier, J., Duquette, P., Couture, R., Antel, J.P., 1999. Bradykinin B1 receptor expression and function on T lymphocytes in active multiple sclerosis. Neurology 53, 2087-2092.*
- Prat, A., Biernacki, K., Pouly, S., Nalbantoglu, J., Couture, R., Antel, J.P., 2000. Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. J Neuropathol Exp Neurol 59, 896-906.*
- Probert, L., Eugster, H.P., Akassoglou, K., Bauer, J., Frei, K., Lassmann, H., Fontana, A., 2000. TNF α signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease. Brain 123 (Pt 10), 2005-2019.*
- Prud'homme, G.J., Piccirillo, C.A., 2000. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF- β 1) in autoimmune diseases. J Autoimmun 14, 23-42.*
- Quan, G., Xie, C., Dietschy, J.M., Turley, S.D., 2003. Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. Brain Res Dev Brain Res 146, 87-98.*
- Racke, M.K., Dhib-Jalbut, S., Cannella, B., Albert, P.S., Raine, C.S., McFarlin, D.E., 1991. Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta 1. J Immunol 146, 3012-3017.*

- Ramsay, G., 1998. *DNA chips: state-of-the art. Nat Biotechnol* 16, 40-44.
- Read, M.A., Neish, A.S., Luscinskas, F.W., Palombella, V.J., Maniatis, T., Collins, T., 1995. *The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. Immunity* 2, 493-506.
- Redwine, J.M., Armstrong, R.C., 1998. *In vivo proliferation of oligodendrocyte progenitors expressing PDGF α R during early remyelination. J Neurobiol* 37, 413-428.
- Reynolds, R., Dawson, M., Papadopoulos, D., Polito, A., Di Bello, I.C., Pham-Dinh, D., Levine, J., 2002. *The response of NG2-expressing oligodendrocyte progenitors to demyelination in MOG-EAE and MS. J Neurocytol* 31, 523-536.
- Rogers, S.D., Peters, C.M., Pomonis, J.D., Hagiwara, H., Ghilardi, J.R., Mantyh, P.W., 2003. *Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocyte hypertrophy in the normal and injured CNS. Glia* 41, 180-190.
- Ruddle, N.H., Bergman, C.M., McGrath, K.M., Lingeheld, E.G., Grunnet, M.L., Padula, S.J., Clark, R.B., 1990. *An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. J Exp Med* 172, 1193-1200.
- Saas, P., Boucraut, J., Walker, P.R., Quicerez, A.L., Billot, M., Desplat-Jego, S., Chicheportiche, Y., Dietrich, P.Y., 2000. *TWEAK stimulation of astrocytes and the proinflammatory consequences. Glia* 32, 102-107.
- Sadovnick, A.D., Armstrong, H., Rice, G.P., Bulman, D., Hashimoto, L., Paty, D.W., Hashimoto, S.A., Warren, S., Hader, W., Murray, T.J., et al., 1993. *A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. Ann Neurol* 33, 281-285.
- Sanderson, R.D., Lalor, P., Bernfield, M., 1989. *B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. Cell Regul* 1, 27-35.
- Santos, D.R., Calixto, J.B., Souza, G.E., 2003. *Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rats. Br J Pharmacol* 139, 271-278.
- Schweitzer, B., Suter, U., Taylor, V., 2002. *Neural membrane protein 35/Lifeguard is localized at postsynaptic sites and in dendrites. Brain Res Mol Brain Res* 107, 47-56.
- Scimone, M.L., Felbinger, T.W., Mazo, I.B., Stein, J.V., Von Andrian, U.H., Weninger, W., 2004. *CXCL12 Mediates CCR7-independent Homing of Central Memory Cells, But Not Naive T Cells, in Peripheral Lymph Nodes. J Exp Med* 199, 1113-1120.
- Serafini, B., Columba-Cabezas, S., Di Rosa, F., Aloisi, F., 2000. *Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. Am J Pathol* 157, 1991-2002.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Aloisi, F., 2004. *Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. Brain Pathol* 14, 164-174.
- Shudo, K., Kinoshita, K., Imamura, R., Fan, H., Hasumoto, K., Tanaka, M., Nagata, S., Suda, T., 2001. *The membrane-bound but not the soluble form of human Fas ligand is responsible for its inflammatory activity. Eur J Immunol* 31, 2504-2511.
- Sobel, R.A., van der Veen, R.C., Lees, M.B., 1986. *The immunopathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis induced in rabbits with bovine proteolipid protein. J Immunol* 136, 157-163.
- Song, K., Chen, Y., Goke, R., Wilmen, A., Seidel, C., Goke, A., Hilliard, B., 2000. *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. J Exp Med* 191, 1095-1104.
- Souza, D.G., Lomez, E.S., Pinho, V., Pesquero, J.B., Bader, M., Pesquero, J.L., Teixeira, M.M., 2004. *Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. J Immunol* 172, 2542-2548.

- Steindler, D.A., Settles, D., Erickson, H.P., Laywell, E.D., Yoshiki, A., Faissner, A., Kusakabe, M., 1995. Tenascin knockout mice: barrels, boundary molecules, and glial scars. *J Neurosci* 15, 1971-1983.
- Steinman, L., 1992. Multiple sclerosis and its animal models: the role of the major histocompatibility complex and the T cell receptor repertoire. *Springer Semin Immunopathol* 14, 79-93.
- Steinman, L., Martin, R., Bernard, C., Conlon, P., Oksenberg, J.R., 2002. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci* 25, 491-505.
- Storch, M.K., Stefferl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallstrom, E., Kerschensteiner, M., Olsson, T., Linington, C., Lassmann, H., 1998. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8, 681-694.
- Stuve, O., Prod'homme, T., Youssef, S., Dunn, S., Neuhaus, O., Weber, M., Hartung, H.P., Steinman, L., Zamvil, S.S., 2004. Statins as potential therapeutic agents in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 4, 237-244.
- Suen, W.E., Bergman, C.M., Hjelmstrom, P., Ruddle, N.H., 1997. A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 186, 1233-1240.
- Sun, Y., Lin, X., Chen, H.M., Wu, Q., Subudhi, S.K., Chen, L., Fu, Y.X., 2002. Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 168, 1457-1465.
- Suter, T., Biollaz, G., Gatto, D., Bernasconi, L., Herren, T., Reith, W., Fontana, A., 2003. The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation. *Eur J Immunol* 33, 2998-3006.
- Suter, T., Malipiero, U., Otten, L., Ludewig, B., Muelethaler-Mottet, A., Mach, B., Reith, W., Fontana, A., 2000. Dendritic cells and differential usage of the MHC class II transactivator promoters in the central nervous system in experimental autoimmune encephalitis. *Eur J Immunol* 30, 794-802.
- Suvannavejh, G.C., Dal Canto, M.C., Matis, L.A., Miller, S.D., 2000. Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 105, 223-231.
- Svensson, L., Abdul-Majid, K.B., Bauer, J., Lassmann, H., Harris, R.A., Holmdahl, R., 2002. A comparative analysis of B cell-mediated myelin oligodendrocyte glycoprotein-experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis in B cell-deficient mice reveals an effect on demyelination. *Eur J Immunol* 32, 1939-1946.
- Swanborg, R.H., 2001. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev* 184, 129-135.
- t Hart, B.A., Brok, H.P., Amor, S., Bontrop, R.E., 2001. The major histocompatibility complex influences the ethiopathogenesis of MS-like disease in primates at multiple levels. *Hum Immunol* 62, 1371-1381.
- Tajouri, L., Mellick, A.S., Ashton, K.J., Tannenberg, A.E., Nagra, R.M., Tourtellotte, W.W., Griffiths, L.R., 2003. Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 119, 170-183.
- Tanabe, K., Bonilla, I., Winkles, J.A., Strittmatter, S.M., 2003. Fibroblast growth factor-inducible-14 is induced in axotomized neurons and promotes neurite outgrowth. *J Neurosci* 23, 9675-9686.
- Tanaka, Y., Yamada, K., Zhou, C.J., Ban, N., Shioda, S., Inagaki, N., 2003. Temporal and spatial profiles of ABCA2-expressing oligodendrocytes in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 455, 353-367.

- Taupin, V., Renno, T., Bourbonniere, L., Peterson, A.C., Rodriguez, M., Owens, T., 1997. Increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, chronic macrophage/microglial reactivity, and demyelination in transgenic mice producing tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system. *Eur J Immunol* 27, 905-913.
- Tracey, K.J., Cerami, A., 1993. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 9, 317-343.
- Tran, N.L., McDonough, W.S., Donohue, P.J., Winkles, J.A., Berens, T.J., Ross, K.R., Hoelzinger, D.B., Beaudry, C., Coons, S.W., Berens, M.E., 2003. The human Fn14 receptor gene is up-regulated in migrating glioma cells in vitro and overexpressed in advanced glial tumors. *Am J Pathol* 162, 1313-1321.
- Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., Bo, L., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338, 278-285.
- Traugott, U., Reinherz, E.L., Raine, C.S., 1983. Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. *Science* 219, 308-310.
- Tseng, C.C., Tseng, C.P., 2000. Identification of a novel secretory leukocyte protease inhibitor-binding protein involved in membrane phospholipid movement. *FEBS Lett* 475, 232-236.
- Tsunoda, I., Kuang, L.Q., Theil, D.J., Fujinami, R.S., 2000. Antibody association with a novel model for primary progressive multiple sclerosis: induction of relapsing-remitting and progressive forms of EAE in H2s mouse strains. *Brain Pathol* 10, 402-418.
- Tucker, R.P., 2001. Abnormal neural crest cell migration after the in vivo knockdown of tenascin-C expression with morpholino antisense oligonucleotides. *Dev Dyn* 222, 115-119.
- Tuohy, V.K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J.A., Kinkel, R.P., 1999. Spontaneous regression of primary autoreactivity during chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Exp Med* 189, 1033-1042.
- van Oosten, B.W., Barkhof, F., Truyen, L., Boringa, J.B., Bertelsmann, F.W., von Blomberg, B.M., Woody, J.N., Hartung, H.P., Polman, C.H., 1996. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 47, 1531-1534.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R., Fiers, W., 1995. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 5, 392-399.
- Vanderlugt, C.L., Rahbe, S.M., Elliott, P.J., Dal Canto, M.C., Miller, S.D., 2000. Treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with the proteasome inhibitor PS-519. *J Autoimmun* 14, 205-211.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L., 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.
- Waisman, A., Ruiz, P.J., Hirschberg, D.L., Gelman, A., Oksenberg, J.R., Brocke, S., Mor, F., Cohen, I.R., Steinman, L., 1996. Suppressive vaccination with DNA encoding a variable region gene of the T-cell receptor prevents autoimmune encephalomyelitis and activates Th2 immunity. *Nat Med* 2, 899-905.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65.
- Walczak, H., Miller, R.E., Arial, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., Schuh, J.C., Lynch, D.H., 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5, 157-163.
- Waldburger, J.M., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., Reith, W., 2001. Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on

- extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene.* *J Exp Med* 194, 393-406.
- Wallberg, M., Wefer, J., Harris, R.A., 2003. *Vaccination with myelin oligodendrocyte glycoprotein adsorbed to alum effectively protects DBA/1 mice from experimental autoimmune encephalomyelitis.* *Eur J Immunol* 33, 1539-1547.
- Walmsley, S.J., Gaines, P.J., 2004. *Identification of two cDNAs encoding synaptic vesicle protein 2 (SV2)-like proteins from epithelial tissues in the cat flea, Ctenocephalides felis.* *Insect Mol Biol* 13, 225-230.
- Wandinger, K.P., Lunemann, J.D., Wengert, O., Bellmann-Strobl, J., Aktas, O., Weber, A., Grundstrom, E., Ehrlich, S., Wernecke, K.D., Volk, H.D., Zipp, F., 2003. *TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis.* *Lancet* 361, 2036-2043.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin, A.S., Jr., 1998. *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation.* *Science* 281, 1680-1683.
- Wang, X., 2001. *The expanding role of mitochondria in apoptosis.* *Genes Dev* 15, 2922-2933.
- Wang, X., Li, X., Xu, L., Zhan, Y., Yaish-Ohad, S., Erhardt, J.A., Barone, F.C., Feuerstein, G.Z., 2003. *Up-regulation of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in the brain after ischemic stroke: adenoviral expression of SLPI protects brain from ischemic injury.* *Mol Pharmacol* 64, 833-840.
- Weerth, S., Berger, T., Lassmann, H., Linington, C., 1999. *Encephalitogenic and neuritogenic T cell responses to the myelin-associated glycoprotein (MAG) in the Lewis rat.* *J Neuroimmunol* 95, 157-164.
- Weinberg, A.D., Wegmann, K.W., Funatake, C., Whitham, R.H., 1999. *Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis.* *J Immunol* 162, 1818-1826.
- Weinshenker, B.G., Santrach, P., Bissonet, A.S., McDonnell, S.K., Schaid, D., Moore, S.B., Rodriguez, M., 1998. *Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS: a population-based study.* *Neurology* 51, 742-747.
- Weitz-Schmidt, G., Welzenbach, K., Brinkmann, V., Kamata, T., Kallen, J., Bruns, C., Cottens, S., Takada, Y., Hommel, U., 2001. *Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site.* *Nat Med* 7, 687-692.
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., Linington, C., 1994. *Animal models.* *Ann Neurol* 36 Suppl, S47-53.
- Westendorf, J.J., Hiebert, S.W., 1999. *Mammalian runt-domain proteins and their roles in hematopoiesis, osteogenesis, and leukemia.* *J Cell Biochem Suppl* 32-33, 51-58.
- Weterman, M.A., Ajubi, N., van Dinter, I.M., Degen, W.G., van Muijen, G.N., Ruitter, D.J., Bloemers, H.P., 1995. *nmb, a novel gene, is expressed in low-metastatic human melanoma cell lines and xenografts.* *Int J Cancer* 60, 73-81.
- White, C.A., McCombe, P.A., Pender, M.P., 1998. *The roles of Fas, Fas ligand and Bcl-2 in T cell apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis.* *J Neuroimmunol* 82, 47-55.
- White, C.A., Nguyen, K.B., Pender, M.P., 2000. *B cell apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of B cell CD95, CD95L and Bcl-2 expression.* *J Autoimmun* 14, 195-204.
- Whitney, L.W., Ludwin, S.K., McFarland, H.F., Biddison, W.E., 2001. *Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions.* *J Neuroimmunol* 121, 40-48.
- Wieder, T., Essmann, F., Prokop, A., Schmelz, K., Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Dorken, B., Daniel, P.T., 2001. *Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-*

- lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3.* *Blood* 97, 1378-1387.
- Wilbanks, G.A., Streilein, J.W., 1992. *Fluids from immune privileged sites endow macrophages with the capacity to induce antigen-specific immune deviation via a mechanism involving transforming growth factor-beta.* *Eur J Immunol* 22, 1031-1036.
- Wildbaum, G., Westermann, J., Maor, G., Karin, N., 2000. *A targeted DNA vaccine encoding fas ligand defines its dual role in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis.* *J Clin Invest* 106, 671-679.
- Wiley, S.R., Cassiano, L., Lofton, T., Davis-Smith, T., Winkles, J.A., Lindner, V., Liu, H., Daniel, T.O., Smith, C.A., Fanslow, W.C., 2001. *A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis.* *Immunity* 15, 837-846.
- Wiley, S.R., Winkles, J.A., 2003. *TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor.* *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 241-249.
- Xie, L., Law, B.K., Aakre, M.E., Edgerton, M., Shyr, Y., Bhowmick, N.A., Moses, H.L., 2003. *Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line.* *Breast Cancer Res* 5, R187-198.
- Xu, L., Hilliard, B., Carmody, R.J., Tsabary, G., Shin, H., Christianson, D.W., Chen, Y.H., 2003. *Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system.* *Immunology* 110, 141-148.
- Yan, H., Rivkees, S.A., 2002. *Hepatocyte growth factor stimulates the proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells.* *J Neurosci Res* 69, 597-606.
- Yano, M., Koumoto, Y., Kanesaki, Y., Wu, X., Kido, H., 2004. *20S proteasome prevents aggregation of heat-denatured proteins without PA700 regulatory subcomplex like a molecular chaperone.* *Biomacromolecules* 5, 1465-1469.
- Youssef, S., Stuve, O., Patarroyo, J.C., Ruiz, P.J., Radosevich, J.L., Hur, E.M., Bravo, M., Mitchell, D.J., Sobel, R.A., Steinman, L., Zamvil, S.S., 2002. *The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease.* *Nature* 420, 78-84.
- Youssef, S., Wildbaum, G., Karin, N., 1999. *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by MIP-1alpha and MCP-1 naked DNA vaccines.* *J Autoimmun* 13, 21-29.
- Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y.C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E., Bottinger, E.P., 2001. *Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6686-6691.
- Zhai, Y., Ni, J., Jiang, G.W., Lu, J., Xing, L., Lincoln, C., Carter, K.C., Janat, F., Kozak, D., Xu, S., Rojas, L., Aggarwal, B.B., Ruben, S., Li, L.Y., Gentz, R., Yu, G.L., 1999. *VEGI, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas in vivo.* *Faseb J* 13, 181-189.
- Zheng, S., Chou, A.H., Jimenez, A.L., Khodadadi, O., Son, S., Melega, W.P., Howard, B.D., 2002. *The fetal and neonatal brain protein neuronatin protects PC12 cells against certain types of toxic insult.* *Brain Res Dev Brain Res* 136, 101-110.
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., Littman, D.R., 1998. *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development.* *Nature* 393, 595-599.

Eigene Veröffentlichungen

Mueller, A.M., Pedre, X., Kleiter, I., Hornberg, M., Steinbrecher, A., Giegerich, G., 2005.

Targeting fibroblast growth factor-inducible-14 signaling protects from chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 159, 55-65.

Steinbrecher, A., Weber, T., Neuberger, T., Mueller, A.M., Pedre, X., Giegerich, G.,

Bogdahn, U., Jakob, P., Haase, A., Faber, C., 2005. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat spinal cord: lesion detection with high-resolution MR microscopy at 17.6 T. *AJNR Am J Neuroradiol* 26, 19-25.

Mueller, A.M., Pedre, X., Kleiter, I., Giegerich G, Steinbrecher, A., 29.Sept.2004. TWEAK,

the TNF-related weak inducer of apoptosis, and its receptor Fn14 in EAE
(Posterpräsentation beim 7th International Congress of Neuroimmunology-Venedig)

Kleiter, I., Pedré, X., Poeschl P., Mueller A.M., Giegerich G, Steinbrecher, A, 30.Sept.2004.

Smad7-inhibition ameliorates EAE without TGF-beta-associated toxicity

(Posterpräsentation beim 7th International Congress of Neuroimmunology-Venedig)

Danksagung

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Freundin Xiomara Pedré Villareal für ihre kompetente Unterstützung bei der täglichen Arbeit und für ihre Geduld, die sich in den letzten Jahren als äußerst strapazierfähig erweisen mußte.

Bei Prof. Dr. Charalampos Aslanidis bedanke ich mich für die Übernahme des Erstgutachten.

Prof. Dr. Ulrich Bogdahn danke ich für die Möglichkeit, die Infrastruktur der Klinik zu benutzen und diese Arbeit durchzuführen.

Gerhard Giegerich und Andreas Steinbrecher danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und die Ausdauer beim ermüdenden Korrekturlesen. Ebenso danke ich Ingo Kleiter für seine Fehlersuche.

Ludwig Deml danke ich dafür, mich auf den Gedanken gebracht zu haben, Alternativen zur DNA-Vakzinierung zu evaluieren.

Christa Büchler danke ich für ihre kurzfristigen Anregungen im Zusammenhang mit dem Cholesterin-Stoffwechsel.

Weiterhin danke ich Thomas Stempfl für die Hilfe bei der Auswertung der Expressionsdaten und Matthias Hornberg, Jutta Schipka und Johannes Dorfner für die zahlreiche Unterstützung in den letzten Jahren.

Last but not least

meiner Mutter

Ceterum censeo Carthaginem esse delendam (Cato, Marcus Porcius (senex))