

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR NEUROLOGIE
KOMMISSARISCHER DIREKTOR: PROF. DR. FELIX SCHLACHETZKI
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IMMUNREAKTIVITÄTEN GEGEN IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM NATÜRLICH
PRÄSENTIERTE PEPTIDE BEI PATIENTEN MIT MULTIPLER SKLEROSE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christine Riedhammer

2017

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR NEUROLOGIE
KOMMISSARISCHER DIREKTOR: PROF. DR. FELIX SCHLACHETZKI
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IMMUNREAKTIVITÄTEN GEGEN IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM NATÜRLICH
PRÄSENTIERTE PEPTIDE BEI PATIENTEN MIT MULTIPLER SKLEROSE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christine Riedhammer

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Robert Weißert
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Markus Feuerer
Tag der mündlichen Prüfung:	19.06.2018

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	9
1.1 Verlaufsformen und Diagnosekriterien der MS.....	9
1.2 Pathogenese der MS.....	10
1.3 Die Rolle von T-Zellen in der MS.....	11
1.3.1 CD4 ⁺ -Zellen	11
1.3.2 CD8 ⁺ -Zellen	12
1.4 Grundlagen der Antigenpräsentation.....	13
1.5 Epitope Spreading.....	13
1.6 Genetische Risikofaktoren für die MS	14
1.7 Autoantigensuche durch Elution und Identifikation von natürlich präsentierten Peptiden	15
1.8 Getestete Antigene und deren Rolle in der MS	15
1.8.1 Myelin-Basisches Protein (MBP).....	16
1.8.2 Saures Gliafaserprotein (GFAP).....	16
1.8.3 Neurofilament.....	17
1.8.4 S100	17
1.8.5 Aktin.....	18
1.8.6 Alpha-Synuclein.....	18
1.8.7 Glutamin-Synthetase und Glutamat-Dehydrogenase.....	19
1.8.8 Survivin	19
1.9 Fragestellung.....	21
2. Material.....	22
2.1 Chemikalien.....	22
2.2 Verbrauchsmaterial	23
2.3 Medien.....	25

2.4	Kits	25
2.5	PCR-Bedarf	25
2.6	Peptide	26
2.7	Kontrollantigene	26
2.8	Geräte	26
2.9	Software	28
3.	Methoden	29
3.1	Studienteilnehmer.....	29
3.2	Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Bluts	29
3.2.1	Aufreinigung von mononukleären Zellen des peripheren Bluts.....	29
3.2.2	Zählen von mononukleären Zellen des peripheren Bluts	30
3.2.3	Einfrieren von mononukleären Zellen des peripheren Bluts.....	31
3.2.4	Auftauen von mononukleären Zellen des peripheren Bluts.....	31
3.3	Auswahl der Peptide für ELISpot Assays	32
3.4	Peptidsynthese und Lagerung.....	36
3.5	ELISpot Assay	36
3.6	ELISpot Auswertung.....	37
3.7	ELISpot und ELISA zum Vergleich der Sensitivität der beiden Assays	38
3.8	HLA-Typisierung auf HLA-DRB1*1501.....	39
3.9	Statistische Auswertung	41
4.	Ergebnisse	42
4.1	Vergleich der Sensitivität von ELISA und ELISpot	42
4.2	Spontan IFN- γ -sezernierende PBMZ.....	43
4.3	Spezifische IFN- γ -sezernierende Zellen gegen eluierte Peptide von MS-Patienten und Kontrollpersonen im Vergleich.....	44
4.4	Spezifische IFN- γ -sezernierende Zellen in aktiver und inaktiver MS.....	45
4.4.1	Reaktionen gegen von MHC-II eluierte Peptide.....	46

4.4.2	Reaktionen gegen von MHC-I eluierte Peptide	46
4.4.3	Reaktionen gegen Kontrollantigene	47
4.5	Spezifische IFN- γ -sezernierende Zellen in verschiedenen Erkrankungsgruppen	47
4.6	Zahl positiver Peptide in aktiver und inaktiver MS	48
4.6.1	Reaktionen gegen von MHC-II eluierte Peptide	49
4.6.2	Reaktionen gegen von MHC-I eluierte Peptide	50
4.6.3	Reaktionen gegen die Peptide im Einzelnen	50
4.7	Frequenzen autoreaktiver PBMZ.....	51
4.8	HLA-DRB1*1501-Typisierung und Reaktivitäten gegen eluierte Peptide im Vergleich	53
4.8.1	Typisierung von MS-Patienten und Kontrollpersonen.....	53
4.8.2	Vergleich Antwort in HLA-DRB1*1501-positiven und -negativen Patienten.....	53
5.	Diskussion.....	55
5.1	Methodik.....	55
5.1.1	Auswahl der eluierten Peptide	55
5.1.2	Nachweis von IFN- γ -sezernierenden Zellen mittels ELISpot	55
5.1.3	Testung der ganzen PBMZ-Fraktion	56
5.2	Elution als Möglichkeit zur Autoantigensuche	56
5.3	IFN- γ zur Charakterisierung autoreaktiver Zellen in der MS.....	57
5.4	Frequenzen autoreaktiver Zellen im Vergleich mit der Literatur	57
5.5	Höhere Frequenzen IFN- γ -sezernierender PBMZ gegenüber eluierten Peptiden in aktiver MS.....	58
5.5.1	Mögliche Gründe für erhöhte Reaktivität in aktiver MS.....	59
5.5.2	Peptide als primäre Autoantigene oder Rolle in Epitope Spreading?....	60
5.5.3	Einfluss von HLA-DRB1*1501.....	61
5.5.4	Unterschiede zwischen von MHC-I und MHC-II eluierten Peptiden	62

5.6	Die getesteten Peptide als mögliche Autoantigene im Einzelnen.....	63
5.6.1	MBP	63
5.6.2	Survivin	64
5.6.3	Saures Gliafaserprotein (GFAP), Neurofilament, und S100.....	65
5.6.4	Aktin.....	66
5.6.5	Alpha-Synuclein.....	66
5.6.6	Glutamin-Synthetase und Glutamat-Dehydrogenase.....	66
5.7	Antigen-spezifische Therapieformen und Ausblick.....	67
5.7.1	DNA-Vakzinierungen	67
5.7.2	T-Zell-Vakzinierungen.....	67
5.7.3	T-Zell-Rezeptor-Peptide.....	68
5.7.4	Veränderte Peptidliganden	68
5.7.5	Anwendungsmöglichkeiten der getesteten eluierten Peptide.....	68
6.	Zusammenfassung.....	70
7.	Anhang.....	71
8.	Literaturverzeichnis	79
9.	Abbildungsverzeichnis.....	102
10.	Tabellenverzeichnis.....	103
	Danksagung	
	Erklärung	

Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigen-präsentierende Zelle(n)
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- Phosphat/Nitroblautetrazolium
CD	Cluster of differentiation
CNPase	2,3-zyklisches Nukleotid- 3-Phosphodiesterase
CIS	Klinisch isoliertes Syndrom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISpot Assay	Enzyme-linked Immunospot Assay
FBS	Fötales Bovines Serum
GFAP	Saures Gliafaserprotein
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN- γ	Interferon- γ
IL-17	Interleukin-17
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin-Basisches Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Multiple Sklerose
NF	Neurofilament
PBMZ	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin

PLP	Proteolipid-Protein
PP-MS	Primär-progrediente multiple Sklerose
rpm	Revolutions per minute
RR-MS	Schubförmig-remittierende multiple Sklerose
SP-MS	Sekundär-progrediente multiple Sklerose
TMB	Tetramethylbenzidin
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

1. Einleitung

Die multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Die Erkrankung ist der häufigste Grund einer anhaltenden Behinderung junger Menschen (Flachenecker et al. 2008, Hirtz et al. 2007). Pathologisch charakteristisch sind so genannte Plaques, Gebiete fokaler Demyelinisierung (Popescu und Lucchinetti 2012). Neben Myelinscheiden werden aber auch Axone (Trapp et al. 1998) und graue Substanz geschädigt (Lucchinetti et al. 2011). Es wird angenommen, dass es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt, wobei aber auch eine heterogene Krankheitsentstehung diskutiert wird (Sospedra und Martin 2016).

In die Therapie von Autoimmunerkrankungen ist in den letzten Jahren durch eine beachtliche Erweiterung der verfügbaren immunsuppressiven und immunmodulatorischen Substanzen viel Bewegung gekommen. Die genauen pathogenetischen Mechanismen in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen sind jedoch meist nicht im Detail verstanden. Bei vielen Autoimmunerkrankungen, unter anderem auch bei der MS, konnten die Antigene, gegen die sich die fehlgeleitete Immunreaktion richtet, bisher nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Eine genauere Kenntnis möglicher Autoantigene ist jedoch auch für ein besseres Verständnis der Pathogenese der Erkrankung essentiell.

1.1 Verlaufsformen und Diagnosekriterien der MS

Um die Diagnose einer MS stellen zu können, muss eine Dissemination der Erkrankung in Ort und Zeit vorliegen. Die Dissemination kann sich bereits klinisch in Form von verschiedene neurologische Funktionssysteme betreffenden Schüben zeigen oder in Kombination aus klinischem und radiologischem Befund festgestellt werden. Im MRT werden als örtliche Dissemination in der T2-Wichtung nachweisbare Läsionen gewertet, die sich an mindestens zwei der typischen Lokalisationen periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell oder spinal befinden. Eine zeitliche Dissemination ist durch den Nachweis gleichzeitig bestehender Gadolinium-anreichernder und –nicht anreichernder Läsionen im MRT oder das Auftreten neuer Läsionen im Verlauf gegeben. (Polman et al. 2011)

Man unterscheidet verschiedene Verlaufsformen der MS. Grundlegend ist die Einteilung in schubförmig-remittierende und progrediente Erkrankungsformen am

bedeutendsten, da die gängigen Therapeutika nur die schubförmigen Verläufe beeinflussen können. Zu den schubförmig-remittierenden Formen zählen das klinisch isolierte Syndrom (CIS = *clinically isolated syndrome*) und die schubförmig-remittierende multiple Sklerose (RR-MS = *relapsing-remitting multiple sclerosis*). Das klinisch isolierte Syndrom besteht in einer umschriebenen Symptomatik wie beispielsweise einer Optikusneuritis, erfüllt aber die diagnostischen Kriterien der örtlichen und zeitlichen Dissemination für eine MS nicht (Polman et al. 2011). Seit der Überarbeitung der Kriterien von Lublin et al. 2014 wird es zu den phänotypischen Verlaufsformen der MS gezählt. Für die schubförmigen Erkrankungsformen ist eine vollständig oder teilweise stattfindende Rückbildung der neurologischen Dysfunktion charakteristisch.

Im Gegensatz dazu kommt es bei den progredienten Erkrankungsformen zu einer zunehmenden Verschlechterung der neurologischen Funktion (Lublin et al. 2014). Man unterscheidet dabei die primär-progrediente multiple Sklerose (PP-MS) und die sekundär-progrediente multiple Sklerose (SP-MS). Nach zehn Jahren geht beim natürlichen Verlauf der Erkrankung eine RR-MS bei der Hälfte der Patienten in eine SP-MS über (Weinshenker et al. 1989).

All die genannten unterschiedlichen Verlaufsformen können sich jeweils als aktive oder inaktive Erkrankung präsentieren. Um als aktive Erkrankung gewertet zu werden, muss eine klinische oder radiologisch nachweisbare Aktivität über einen bestimmten Zeitraum vorliegen. Diese Aktivität kann sich klinisch als Schub in Abwesenheit von Fieber oder einer Infektion manifestieren oder aber in der MRT-Bildgebung in Form von kontrastmittelaufnehmenden Läsionen in der T1-Wichtung oder in Form von neuen oder größenprogredienten Läsionen in der T2-Wichtung auffallen. (Lublin et al. 2014)

1.2 Pathogenese der MS

Man geht davon aus, dass bei der MS autoreaktive T-Zellen eine wichtige pathogenetische Rolle spielen. Deren Existenz und Fähigkeit zur Selbstschädigung setzen ein Unterbleiben zentraler und peripherer Toleranzentwicklung sowie eine periphere Aktivierung voraus. Autoreaktive Zellen kommen allerdings auch bei Gesunden vor (Burns et al. 2001, Goebels et al. 2000, Meinl et al. 1993, Melms et al. 1992) und haben somit nicht zwingend pathologische Bedeutung. Im Thymus findet die so genannte zentrale Toleranzentwicklung statt. Dabei werden bei der negativen Selektion T-Zellen eliminiert, bei denen die Interaktionen der T-Zell-Rezeptoren mit

von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) auf Major Histocompatibility Complex (MHC) präsentierten körpereigenen Peptiden eine hohe Avidität zeigen (Ashton-Rickardt et al. 1994). Möglichkeiten für autoreaktive T-Zellen, dieser negativen Selektion zu entgehen, sind entweder eine mangelnde Präsentation des durch sie erkannten körpereigenen Peptids (Mamula 1993) oder eine zu geringe Avidität der Interaktion des T-Zell-Rezeptor-Peptid-MHC-Komplexes (Liu et al. 1995). T-Zellen, die der zentralen Toleranzinduktion im Thymus entkommen sind, sind jedoch noch „naiv“. Zu ihrer Aktivierung ist ein Antigenkontakt in der Peripherie nötig. Bei T-Zellen, die wie im Fall der MS mutmaßlich vor allem ZNS-Antigene erkennen, sind dabei zwei verschiedene Szenarien denkbar: Die Aktivierung könnte einerseits in ZNS-drainierenden Halslymphknoten stattfinden, wo ZNS-Antigene dann durch APZ aufgenommen werden. (Goverman 2009) Andererseits wird die Rolle von Infektionen diskutiert, in denen strukturelle Ähnlichkeiten zwischen infektiösen Agenzien und körpereigenen Proteinen (molekulares Mimikry) eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen begünstigen können (Wucherpfennig und Strominger 1995), oder die Aktivierung als unspezifischer Nebeneffekt im Rahmen der auftretenden Immunantwort passiert (Bystander-Aktivierung) (Haring et al. 2002).

1.3 Die Rolle von T-Zellen in der MS

1.3.1 CD4⁺-Zellen

Die MS wird weithin als eine CD4⁺-Zell-vermittelte Erkrankung gesehen, wenn auch andere Zelltypen eine potenzielle pathogenetische Rolle spielen (Sospedra und Martin 2005). Die Evidenz dafür erbrachten Daten aus dem Tiermodell der Erkrankung, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), aber auch Untersuchungen von MS-Patienten selbst.

In einem humanisierten Mausmodell, in dem transgene Mäuse einen Myelinantigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor, den MS-assoziierten Human Leukocyte Antigen (HLA)-Typ DR2 und CD4⁺ exprimierten, entwickelten die Tiere eine MS-ähnliche Erkrankung (Madsen et al. 1999). In demyelinisierenden Läsionen von MS-Patienten wurden auch CD4⁺-Zellen nachgewiesen (Lock et al. 2002) und in peripherem Blut und Liquor von MS-Patienten wurden mehr aktivierte Myelin-reaktive CD4⁺-Zellen im Vergleich zu Kontrollen gefunden (Zhang et al. 1994).

CD4⁺-Zellen lassen sich in verschiedene Subgruppen unterteilen, von denen Th1-Zellen und Th17-Zellen die größte Bedeutung in der MS haben.

Th1-Zellen sind unter anderem durch die Produktion von IFN- γ charakterisiert (Mosmann et al. 1986). Sie spielen nicht nur eine überragende Rolle im EAE-Tiermodell (Lowther et al. 2013), sondern auch in der humanen Erkrankung: Myelin-spezifische IFN- γ -sezernierende Zellen wurden in erhöhter Zahl in Blut und Liquor von MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen gefunden (Olsson et al. 1990). In verschiedenen Studien wurden erhöhte Th1-Zellen vor allem in Patienten mit aktiver Erkrankung nachgewiesen (Nakajima et al. 2004, Shimizu et al. 2011, Tejada-Simon et al. 2001). Zudem führen IFN- γ -sezernierende Th1-Zellen im EAE-Modell auch zu einer Reduktion von Connexin 43 in Gap junctions zwischen Astrozyten (Watanabe et al. 2016) - eine Reduktion, die beim Menschen mit einem aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert ist (Masaki et al. 2013).

Neben den Th1-Zellen gewannen in den letzten Jahren auch Th17-Zellen in der Erforschung der MS eine zunehmende Bedeutung. Eine erhöhte IL-17-Expression und vermehrte Zahl von Th17-Zellen wurden in aktiven Läsionen von MS-Patienten nachgewiesen (Tzartos et al. 2008). Auch eine Korrelation von aktiven Läsionen im MRT oder klinisch aktiver Erkrankung mit durch Myelin-Antigen induzierter IL-17-Produktion (Durelli et al. 2009, Heedegard et al. 2008, Wing et al. 2015) sowie erhöhte Zahlen IL-17-sezernierender Gedächtnis-T-Zellen in MS-Patienten (Venken et al. 2010) wurden gezeigt.

Letztendlich spielen in der MS wahrscheinlich sowohl Th1- als auch Th17-Zellen eine wichtige Rolle. Aktuelle Studien zeigen, dass unterschiedliche Lokalisationen der MS-Läsionen wie spinal oder zerebral mit unterschiedlichen vorherrschenden CD4⁺-Zell-Arten (Th1/Th17) assoziiert sein können (Gross et al. 2017, Johnson et al. 2016). Weiterhin wurden CD4⁺-Zellen nachgewiesen, die sowohl IL-17 als auch IFN- γ produzieren, und die vermehrt bei MS-Patienten mit aktiver oder besonders aggressiver Erkrankung auftreten (Durelli et al. 2009, Kebir et al. 2009, Paroni et al. 2017).

1.3.2 CD8⁺-Zellen

Neben den CD4⁺-Zellen wurde auch zunehmend für CD8⁺-Zellen eine Bedeutung in der MS gezeigt. In aktiven demyelinisierenden ZNS-Läsionen übersteigt die Zahl der CD8⁺-Zellen sogar die der CD4⁺-Zellen (Babbe et al. 2000). In MS-Patienten wurden verglichen mit Kontrollen auch vermehrt Myelin-reaktive CD8⁺-Zellen gefunden (Zang et al. 2004). Ebenso zeigten sich im Liquor von MS-Patienten vermehrt CD8⁺-

Gedächtniszellen (Jacobsen et al. 2002, Liu et al. 2007) und während Schüben erhöhte Granzym-Spiegel als Ausdruck einer gesteigerten CD8⁺-Zell-Toxizität (Malmeström et al. 2008). Andererseits existieren aber auch protektive CD8⁺-Zell-Populationen, für deren Funktion interessanterweise gerade IFN- γ eine wichtige Rolle spielt (Balashov et al. 1995).

1.4 Grundlagen der Antigenpräsentation

Die Antigenpräsentation ist ein wichtiger Schritt in der Aktivierung von T- und B-Zellen während des Ablaufs einer Immunantwort.

Alle kernhaltigen Zellen präsentieren zelleigene Peptide nach Prozessierung abzubauenender Proteine unter anderem durch das Proteasom auf MHC-I-Molekülen (Neefjes et al. 2011). Auf MHC-I präsentierte Peptide werden von CD8⁺-Zellen erkannt. MHC-II-Moleküle werden dagegen hauptsächlich von professionellen APZ wie dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Zellen exprimiert, die darauf Peptide von extrazellulären Proteinen, die über Endozytose in die Zelle aufgenommen wurden, präsentieren (Neefjes et al. 2011). CD4⁺-Zellen können mit MHC-II-exprimierenden Zellen interagieren. Auf MHC-I-Molekülen werden bevorzugt Peptide einer Länge von etwa neun Aminosäuren präsentiert, aber auch die Präsentation längerer Peptide ist möglich (Engelhard 1994). Peptide, die auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden, weisen mit etwa 13-18 Aminosäuren meist eine größere Länge auf, die allerdings variieren kann (Chicz et al. 1993, Rudensky et al. 1991). Eine wichtige Verbindung der beiden Wege stellt die sogenannte Kreuzpräsentation dar. Dadurch können APZ auch Peptide auf MHC-I präsentieren, die von exogen aufgenommen wurden, und damit die CD8⁺-Zell-getragene Immunantwort anfachen. Als zur Kreuzpräsentation fähige APZ werden in vivo vor allem dendritische Zellen diskutiert (Ackerman und Cresswell 2004).

1.5 Epitope Spreading

Im Laufe einer physiologischen Immunreaktion kann sich die Immunantwort auf andere Antigen-Epitope ausweiten, was eine Pathogenbekämpfung sinnvoll unterstützt. Jedoch kommt dieser Prozess auch bei Autoimmunerkrankungen zum Tragen und wurde auch bei der MS beobachtet. Die Immunantwort kann dabei andere Antigen-Epitope innerhalb eines Antigens einbeziehen (intramolekulares Epitope Spreading), was auch bei MS-Patienten vielfach nachgewiesen wurde (Goebels et al. 2000, Ristori et al. 2000, Tuohy et al. 1997, Tuohy et al. 1998, Uccelli et al. 2000). Andererseits kann

sich die Immunantwort auch auf andere Antigene (intermolekulares Epitope Spreading) ausweiten. Auch dieses Phänomen wurde in der MS direkt beobachtet (Muraro et al. 2003). Indirekt wurden weiterhin bei Patienten mit längerer Krankheitsdauer Reaktivitäten gegen mehr Myelin-Epitope als bei kürzerer Krankheitsdauer festgestellt (Davies et al. 2005).

Sowohl intra- als auch intermolekulares Epitope Spreading zeigte sich interessanterweise auch früh im Krankheitsverlauf bei pädiatrischer MS, trat im Gegensatz dazu aber bei einmalig demyelinisierenden Ereignissen nicht auf (Quintana et al. 2014), was für eine frühe Relevanz des Prozesses in der Krankheitsentwicklung spricht. Es ist leicht vorstellbar, dass sich dadurch die Suche nach einem primären Autoantigen und auch eine vielleicht in der Zukunft mögliche potenzielle Immuntherapie stark verkomplizieren kann.

1.6 Genetische Risikofaktoren für die MS

Bei der MS handelt es sich nicht um eine klassische Erbkrankheit. Bisher wurden aber über 100 Risiko-Loci in genomweiten Assoziationsstudien identifiziert (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium 2013). Das größte genetische Risiko für die Erkrankung wird durch das HLA-Allel DRB1*1501 vermittelt (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium 2011), was auch die Hypothese einer pathogenetisch großen Bedeutung von CD4⁺-Zellen unterstützt. Die Frequenz des Allels bewegt sich bei MS-Patienten in etwa zwischen 35-45% (Lysandropoulos et al. 2017, Smestad et al. 2007, Zhang et al. 2011), bei Kontrollen zwischen 21-24% (Goris et al. 2008, Lysandropoulos et al. 2007, Zhang et al. 2011). Homozygote Allelträger zeigen ein höheres Risiko für die Entwicklung der Erkrankung sowie für einen schwereren Verlauf (Barcellos et al. 2003). Eine Assoziation mit HLA-Molekülen besteht auch bei anderen Autoimmunerkrankungen abgesehen von der MS. Ein möglicher Zusammenhang wird darin gesehen, dass HLA-Moleküle die Peptide, die T-Zellen präsentiert werden, beeinflussen (Jones et al. 2006). Dies hat sowohl Auswirkungen auf die Reifung der T-Zellen im Thymus inklusive der zentralen Toleranzentwicklung als auch auf die Antigen-Erkennung durch reife T-Zellen (Thorsby et al. 2005). Neben der HLA-Assoziation kodieren auch viele andere der identifizierten Risikogene für Funktionen des Immunsystems (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium 2013).

1.7 Autoantigensuche durch Elution und Identifikation von natürlich präsentierten Peptiden

Verschiedene Antigene wurden bisher als mögliche Autoantigene in der MS diskutiert, die größte Bedeutung wird dabei weiterhin Myelinantigenen beigemessen. An Myelinantigenen werden vor allem Myelin-Basisches Protein (MBP), Proteolipid Protein (PLP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) und 2,3-zyklisches Nukleotid-3-Phosphodiesterase (CNPase) diskutiert, aber auch gliale und astrozytäre Antigene werden als potenzielle Autoantigene in Betracht gezogen.

Ein spezieller Ansatz zur möglichen Identifizierung von Autoantigenen wurde in einer Studie von Fissolo et al. verfolgt (Fissolo et al. 2009), die sich zum Ziel gesetzt hatte, auf HLA-Molekülen im ZNS von MS-Patienten präsentierte Peptide zu bestimmen. Diese Studie dient als Grundlage der vorliegenden Arbeit. Für die Studie hatten Gehirn-Autopsieproben von acht MS-Patienten zur Verfügung gestanden. Dabei hatte es sich um Proben von sechs Patienten mit SP-MS (davon vier weiblich und zwei männlich), einer PP-MS-Patientin und einer Patientin mit einer unklaren Verlaufsform der Erkrankung gehandelt.

Aus den gefrorenen Gewebeproben waren mittels Immunaффinitätschromatographie zunächst HLA-Moleküle und daran gebundene Peptide mit Hilfe von gegen HLA gerichteten Antikörpern gewonnen worden. Anschließend waren die Peptide in mehreren Schritten von den HLA-Molekülen isoliert worden. Zur Ermittlung der Sequenz der erhaltenen Peptide diente die Methode der Massenspektrometrie unter Verwendung von Elektrosprayionisation. Die Bindungskapazität der erhaltenen Peptide an die HLA-Typen der jeweiligen Autopsieproben-Donator war mittels der Datenbank SYFPEITHI festgestellt worden.

In der Arbeit von Fissolo et al. konnten insgesamt 118 Peptide von MHC-I-Molekülen und 191 Peptide von MHC-II-Molekülen eluiert und identifiziert werden.

1.8 Getestete Antigene und deren Rolle in der MS

Einige der von Fissolo et al. (Fissolo et al. 2009) identifizierten Peptide wurden in der vorliegenden Arbeit näher auf eine mögliche Rolle als Autoantigene in der MS untersucht. Die Antigene, von denen die getesteten Peptide abgeleitet sind, und ihre bisher vermutete Rolle in der MS sollen im Folgenden näher erläutert werden.

1.8.1 Myelin-Basisches Protein (MBP)

Ein wichtiges potenzielles Autoantigen stellt das Myelin-Basische Protein (MBP) dar. Dieses Myelinprotein kommt sowohl in peripherem als auch in zentralem Myelin vor, was eine periphere Aktivierung naiver MBP-spezifischer T-Zellen potenziell erleichtern könnte. In verschiedenen Studien wurden in MS-Patienten erhöhte Zahlen an (aktivierten) MBP-spezifischen T-Zellen gefunden (Chou et al. 1991, Moldovan et al. 2003, Olsson et al. 1992, Söderström et al. 1993, Tejada-Simon et al. 2001), teils mit einer Anreicherung MBP-reaktiver Zellen im Liquor gegenüber dem peripheren Blut (Söderström et al. 1993). Ebenfalls wurde gezeigt, dass ein MBP-Peptid in MS-Läsionen des ZNS vorkommt (Krogsgaard et al. 2000).

Die autoantigene Relevanz von MBP wurde und wird so hoch eingeschätzt, dass bereits verschiedene antigenspezifische therapeutische Ansätze durchgeführt wurden, beispielsweise mit veränderten Peptidliganden (Bielekova et al. 2000, Kappos et al. 2000), DNA-Vakzinierungen (Bar-Or et al. 2007, Garren et al. 2008), oder T-Zell-Vakzinierungen (Medaer et al. 1995), bei denen eine Veränderung MBP-spezifischer Immunantworten teils mit dem klinischen Bild korrelierte.

Zusammenfassend handelt es sich bei MBP um eines der vielversprechendsten diskutierten Autoantigene der Erkrankung.

1.8.2 Saures Gliafaserprotein (GFAP)

GFAP ist das vorherrschende Intermediärfilament in Astrozyten. GFAP wird vermehrt bei Auftreten von Astrogliose gefunden, in MS-Läsionen mit aktivierten Astrozyten wurde eine vermehrte Expression beobachtet (Newcombe et al. 1986). In Untersuchungen mit humanem Material wurden erhöhte GFAP-Spiegel im Liquor teils korrelierend mit der neurologischen Einschränkung (meist gemessen mittels EDSS-Score) (Avsar et al. 2012, Axelsson et al. 2011, Malmeström et al. 2003, Norgren et al. 2004, Petzold et al. 2002, Rosengren et al. 1995) und im Blut (Avsar et al. 2012) gefunden. Eine Autoimmunreaktion gegen GFAP wurde bisher in der MS nicht beschrieben, im EAE-Tiermodell konnte aber interessanterweise die Entwicklung einer MS-ähnlichen Erkrankung durch GFAP-reaktive CD8⁺-Zellen gezeigt werden (Sasaki et al. 2014).

1.8.3 Neurofilament

Bei Neurofilament handelt es sich ebenfalls um ein Intermediärfilament, das charakteristischerweise in Neuronen vorkommt. Nach ihrer Masse werden drei Untereinheiten unterschieden: eine Leichtkette des Neurofilaments (NF-L), eine mittelschwere Kette (NF-M) und eine schwere Kette (NF-H) (Teunissen et al. 2005).

Neurofilament wird ähnlich wie GFAP als Biomarker in der MS diskutiert. Im Liquor zeigten sich erhöhte Werte für NF-L bei MS-Patienten im Vergleich zu Normalpersonen (Avsar et al. 2012, Lycke et al. 1998, Malmeström et al. 2003, Norgren et al. 2003, Norgren et al. 2004, Semra et al. 2002), in anderen Studien dagegen ergab sich kein Unterschied (Axelsson et al. 2011). Auch bei anderen neurologischen Erkrankungen kommt es zu vermehrt NF-L im Liquor (Norgren et al. 2003). Eine Studie fand erhöhte Werte während Schüben von RR-MS-Patienten (Lycke et al. 1998).

Interessanterweise wurden auch Autoimmunreaktionen gegen Neurofilament gefunden. Verschiedene Studien zeigten erhöhte Autoantikörper gegen NF-M im Liquor von MS-Patienten (Bartos et al. 2007), erhöhte Autoantikörper gegen NF-L bei MS-Patienten mit progredienten Erkrankungsformen (Silber et al. 2002), sowie eine Assoziation von Autoantikörpern gegen NF-L und Gehirnatrophie (Eikelenboom et al. 2003). Bezüglich der zellulären Immunreaktion hingegen fand eine Studie keinen Unterschied in der T-Zell-Proliferation in Reaktion auf NF-L zwischen MS-Patienten und Kontrollpersonen (Huizinga et al. 2009).

1.8.4 S100

Bei S100 handelt sich um ein Kalzium-bindendes Protein, das unter anderem in Astrozyten vorkommt (Donato 2001). Eine mögliche Rolle von S100- β in der MS wird schon seit vielen Jahren diskutiert.

Im Liquor und/oder Blut von MS-Patienten oder bestimmten Subgruppen von MS-Patienten fanden sich in einigen Studien signifikant höhere S100- β -Level im Vergleich zu Kontrollpersonen (Bartosik-Psujek et al. 2011, Missler et al. 1997, Mitosek-Szewczyk et al. 2011, Petzold et al. 2002, Rejdak et al. 2008), andere Studien zeigten hingegen keinen Unterschied zwischen verschiedenen Subgruppen oder MS-Patienten und Kontrollpersonen (Hein et al. 2008, Jongen et al. 1997, Lim et al. 2004, Malmeström et al. 2003, Rostasy et al. 2004).

Neben dieser möglichen Rolle als Biomarker in der MS wurden bisher keine Autoimmunantworten im Menschen gegen dieses Antigen beschrieben. Im Tiermodell allerdings wurde gezeigt, dass S100- β -spezifische T-Zellen eine MS-ähnliche Erkrankung induzieren können (Kojima et al. 1994).

1.8.5 Aktin

Aktin ist wie Neurofilament ein Bestandteil des Zytoskeletts und besitzt unter anderem für die Bewegung von Zellen große Bedeutung. Über eine mögliche Rolle in der MS ist bisher nur sehr wenig bekannt. Erhöhte Werte im Liquor finden sich im Vergleich zu Normalpersonen in verschiedenen neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen, beispielsweise der Alzheimer-Krankheit (Semra et al. 2002). Auch in MS-Patienten mit progredienten Erkrankungsformen (SP-MS und PP-MS) wurden signifikant höhere Aktin-Level als in Normalpersonen oder RR-MS-Patienten gefunden, die mit dem per EDSS-gemessenen Grad der Behinderung korrelierten (Semra et al. 2002).

1.8.6 Alpha-Synuclein

Alpha-Synuclein kommt unter anderem im Zytoplasma von Neuronen und Gliazellen im ZNS vor (Mori et al. 2002). Es gibt Hinweise für eine Rolle von Alpha-Synuclein in der MS und im EAE-Modell. Im Tiermodell zeigte sich im Verlauf der EAE eine Reduktion von alpha-Synuclein, in alpha-Synuclein-defizienten Tieren wurde ein mit erhöhter Th1-Zellantwort assoziierter früherer Symptombeginn im EAE-Verlauf beobachtet (Ettle et al. 2016).

Bei MS-Patienten zeigten sich teils kontroverse Ergebnisse: Teilweise fanden sich bei MS-Patienten niedrigere alpha-Synuclein-Spiegel im Liquor als in Kontrollpersonen mit anderen neurologischen Erkrankungen (Antonelou et al. 2015), teilweise erhöhte alpha-Synuclein-Spiegel im Vergleich zu Kontrollen (Wang et al. 2012). In pathologischen Untersuchungen wurden vermehrt alpha-Synuclein-positive Zellen in (aktiven) demyelinisierenden Läsionen von MS-Patienten gefunden (Lu et al. 2009, Papadopoulos et al. 2006).

Insgesamt wurde in den genannten Studien bisher eher ein direkter Beitrag von alpha-Synuclein zu neuronalem Zelltod diskutiert als eine mögliche Rolle als Autoantigen beschrieben.

1.8.7 Glutamin-Synthetase und Glutamat-Dehydrogenase

Glutamat wird als exzitatorischem Neurotransmitter unter dem Stichwort der „Exzitotoxizität“ schon länger eine Rolle in der MS zugeschrieben. Man nimmt an, dass erhöhte Glutamatspiegel durch ihre Beeinflussung von Ionenkanälen zu einer Kalziumüberladung, Mitochondriopathie, Produktion proteolytischer Enzyme und Begünstigung von Apoptose führen können (Gonsette 2008). In der EAE hat eine Blockade von Glutamatrezeptoren einen milderen Krankheitsverlauf und geringeren Untergang von Oligodendrozyten zur Folge (Pitt et al. 2000).

Aber auch beim Menschen gibt es Hinweise auf eine neurotoxische Rolle von Glutamat: Erhöhte Glutamat-Spiegel fanden sich im Liquor von Patienten mit aktiver MS-Erkrankung (Stover et al. 1997) und konnten mittels MRT in aktiven MS-Läsionen gezeigt werden (Srinivasan et al. 2005). Auch neuropathologische Untersuchungen zeigten ein erhöhtes Vorkommen des die Glutamat-Produktion katalysierenden Enzyms Glutaminase in Makrophagen und Mikroglia in aktiven MS-Läsionen (Werner et al. 2001). Diese erhöhte Glutamat-Produktion in Immunzellen scheint allerdings nicht auf die MS beschränkt, sondern wurde auch in anderen, nicht autoimmunbedingten entzündlichen ZNS-Erkrankungen beobachtet (Werner et al. 2001).

Die beiden Enzyme Glutamin-Synthetase und Glutamat-Dehydrogenase sind beide am Glutamat-Abbau beteiligt. Im Tiermodell EAE konnte bereits gezeigt werden, dass beide Enzyme während der Erkrankung vermindert sind (Hardin-Pouzet et al. 1997). Beispielsweise eine durch oxidativen Stress verminderte Enzymaktivität von Glutamin-Synthetase könnte dabei zu erhöhten Glutamatspiegeln beitragen (Castegna et al. 2011). Aber auch histologische Untersuchungen beim Menschen zeigten eine Verminderung der beiden Enzyme in Oligodendrozyten aktiver MS-Läsionen (Werner et al. 2001).

1.8.8 Survivin

Survivin interagiert mit dem Spindelapparat während der Mitose und übt eine anti-apoptotische Funktion aus (Li et al. 1998). In Mitogen-stimulierten T-Lymphozyten von MS-Patienten wurde eine erhöhte Survivin-Expression im Vergleich zu Kontrollen und Patienten mit anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen gefunden (Sharief et al. 2001), interessanterweise aber auch in höherem Maß bei Patienten mit aktiver MS als mit inaktiver MS (Sharief et al. 2002a). Die Expression war dabei zu Erkrankungsbeginn am höchsten, korrelierte mit der Krankheitsaktivität im MRT

(Sharief et al. 2002a) und nahm nach Therapieeinleitung mit Interferon-beta-1a ab (Sharief et al. 2002b). Obwohl diese Unterschiede nur in Mitogen-stimulierten T-Zellen nachgewiesen werden konnten, deuten die Daten auf eine mögliche verminderte Apoptosefähigkeit und mögliche Rolle dieser Beobachtung in der Autoimmunkaskade der MS hin.

1.9 Fragestellung

Die MS ist eine Autoimmunerkrankung, bei der Myelinscheiden des zentralen Nervensystems angegriffen werden und Patienten je nach Lokalisation der Demyelinisierungsherde zunächst meist an schubförmigen neurologischen Symptomen und dann an langsam fortschreitender Behinderung leiden. Trotz immensen Forschungsanstrengungen und großem Wissenszugewinn über die Erkrankung bleiben die Pathogenese und die zugrundeliegenden Autoantigene, gegen die sich die Immunreaktion richtet, zum Teil unverstanden. Für die Entwicklung jeder Immunantwort, und somit auch Autoimmunantwort, spielt die Antigenpräsentation eine zentrale Rolle. Sie beeinflusst sowohl die Toleranzentwicklung von Immunzellen als auch ihre mögliche Aktivierung in der Peripherie. Ein interessanter Ansatz zur Suche von möglichen Autoantigenen ist somit die Betrachtung der Peptide, die auf antigenpräsentierenden Zellen im Zielorgan einer Autoimmunerkrankung präsentiert werden. Dieser Ansatz wurde von Fissolo et al. verfolgt, denen es gelang, über 300 Peptide von MHC-I- und MHC-II-Molekülen aus Autopsieproben des ZNS von MS-Patienten zu eluieren und identifizieren.

Für die vorliegende Untersuchung wurden einige der von Fissolo et al. identifizierten Peptide ausgewählt, die sich durch ihre Elution aus unterschiedlichen Autopsieproben und von unterschiedlichen HLA-Molekülen auszeichneten, darunter meist auch HLA-DRB1*1501, dem größten bekannten genetischen Risikofaktor für die MS.

Die MS stellt eine von CD4⁺-Zellen unterhaltene Erkrankung dar. Dabei wird besonders auch Th1-Zellen, deren Signatur-Zytokin IFN- γ ist, eine wichtige Rolle zugeschrieben.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war nun, einige dieser von Fissolo et al. identifizierten Peptide daraufhin zu untersuchen, ob sie tatsächlich eine mögliche Rolle als Autoantigene in der MS spielen könnten. Dafür sollte die Zahl von IFN- γ -sezernierenden mononukleären Zellen des peripheren Bluts von MS-Patienten nach Stimulation mit den ausgewählten Peptiden mit Kontrollpersonen verglichen werden. Dabei interessierte vor allem auch eine mögliche Korrelation der Immunreaktion mit der Krankheitsaktivität. Aufgrund der Elution vieler ausgewählter Peptide von HLA-DRB1*1501 und der Risikovermittlung für die Erkrankung durch dieses Allel war eine weitere Frage dieser Arbeit, wie sich Immunantworten in HLA-DRB1*1501-positiven und -negativen MS-Patienten unterscheiden würden.

2. Material

2.1 Chemikalien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol, Rotipuran® >99.8% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Fötale Bovines Serum (FBS), Lot Nr. 0317 A	Biochrom, Berlin
Heparin-Natrium, 25.000 IE	Ratiopharm, Ulm
L-Glutamin (200 mM)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lymphoprep™	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml bzw. 10.000 µg/ml)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Reinstwasser, steril, geeignet für HPLC	Biochrom, Berlin
RPMI Medium 1640	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Schwefelsäure 96%	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe
Türks Lösung	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasser, steril, DEPC-behandelt, DNase- und RNasefrei	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.2 Verbrauchsmaterial

Aluminiumfolie Rotilabo®	Carl Roth, Karlsruhe
Cellstar® Propylen-Röhrchen, konischer Boden, steril	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
- 50 ml	
- 15 ml	
Cellstar® Serologische Pipetten, Papier-Kunststoff-Verpackung, einzeln verpackt, steril	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
- 1 ml	
- 2 ml	
- 5 ml	
- 10 ml	
- 25 ml	
Cryo.s™ Polypropylen, steril, 2 ml, Innengewinde	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
DNA-LoBind Tubes, 1.5 ml	Eppendorf, Hamburg
Einmal-Reagenzreservoir, 100 ml, steril, einzeln verpackt	Carl Roth, Karlsruhe
Kryo-Etiketten für Laserdrucker	Diversified Biotech, Dedham, USA
Millex-GV Filtereinheit, PVDF-Membran, 0.22 µm Porengröße	Merck Millipore, Billerica, USA
Millex-HV Filtereinheit, PVDF-Membran, 0.45 µm Porengröße	
NUNC™ MicroWell™ Platten mit Nunclon™ Delta Oberfläche	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NUNC™ unbehandelte Kolben	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Pasteurpipetten, Natron-Kalk-Glas	Brand, Wertheim
PCR-Folie: Microseal® B Adhesive Seals	Bio-Rad, Hercules, USA
PCR-Platte: Multiplate™ 96-well, low profile, ohne seitlichen Rand	Bio-Rad, Hercules, USA
Pipettenspitzen epT.I.P.S.® Standard	Eppendorf, Hamburg
- 0.1 – 10 µl	
- 0.1 – 20 µl	
- 2 – 200 µl	
- 50 – 1000 µl	
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim
- 2 – 200 µl	
- 5 – 300 µl	
Pipettenspitzen 0.1 – 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen SurPhob SafeSeal® Filterspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
- 10 µl	
- 20 µl	
- 100 µl	
- 1250 µl	
Spritzen	
- 50 ml Injektomat® Spritze mit Kanüle	Fresenius Kabi, Bad Homburg
- 20 ml BD Plastipak™ mit BD Luer-Lok™-Ansatz	BD, Franklin Lakes, USA
Transferpipette, steril, 3.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Medien

Einfriermedium

80% FBS

20 % DMSO

Zellmedium

RPMI

10% FBS

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2.4 Kits

Human IFN-γ ELISPOT^{PRO} (HRP)

Mabtech, Nacka Strand,

Human IFN-γ ELISPOT^{PRO} (ALP)

Schweden

Human IFN gamma ELISA Ready Set Go!

Affymetrix eBioscience, San
Diego, USA

innuPREP Blood DNA Mini Kit

Analytik Jena, Jena

2.5 PCR-Bedarf

Primer für HLA-DRB1*1501

- Vorwärtsprimer:

5'-CCTTTCCCGGTAAAATATCTGAATG-3'

Invitrogen/Thermo Fisher

Scientific, Waltham, USA

- Rückwärtsprimer:

5'-CCATGCATTCTGAGATCCATACCTT-3'

Sonden

- VIC-5'-CAACAAACCAATCC-3'-MGB

Applied Biosystems/ Thermo

- FAM-5'-CAACAAACCAACCC-3'-MGB

Fisher Scientific, Waltham, USA

Taqman[®] Universal PCR Master Mix

Applied Biosystems/ Thermo

Fisher Scientific, Waltham, USA

2.6 Peptide

Die einzelnen Peptide werden im Methoden-Teil aufgelistet. Sie wurden von der Firma Pepscan (Lelystad, Norwegen) bezogen, wo sie synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt wurden.

2.7 Kontrollantigene

Mycobacterium tuberculosis, PPD für
in vitro-Gebrauch

Statens Serum Institut,
Kopenhagen, Dänemark

Phytohämagglutinin

Calbiochem, San Diego, USA

Tetanus Toxoid (Lot #19119A1)

List Biological Laboratories,
Campell, USA

2.8 Geräte

Autoklav: Systec VE-150

Systec, Linden

CFX96 Touch™ Real-Time System

BioRAD, Hercules, USA

ELISA Reader: Varioskan Flash

Thermo Fisher Scientific,
Waltham, USA

ELISpot Reader

Advanced Imaging Devices,
Strassberg

Eppendorf Research® Plus Pipetten

Eppendorf, Hamburg

- Einkanal, 0.1 – 2.5 µl
- Einkanal, 0.5 – 10 µl
- Einkanal, 2 – 20 µl
- Einkanal, 10 – 100 µl
- Einkanal, 100 – 1000 µl
- 8-Kanal, 10 – 100 µl

Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control

Vacuubrand, Wertheim

Gefrierschrank

- -20°C: Liebherr TGS 5200 (Profi Line) Liebherr, Bulle, Schweiz
- -80°C: Forma 900 Series (Modell 905) Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Heracell™ 150 CO₂-Inkubator

Thermo Fisher Scientific,
Waltham, USA

Kaltlichtquelle KL 1500 LCD

Leica, Wetzlar

Kühlschrank: Liebherr KT 1830 (Comfort Line)

Liebherr, Bulle, Schweiz

Lichtmikroskop Olympus CK30

Olympus, Shinjuku, Tokio,
Japan

Nanophotometer P300

Implen, München

PCR-Cooler

Eppendorf, Hamburg

Pipetboy

Integra, Plainsboro, New
Jersey, USA

Sicherheitswerkbank: Herasafe KS12

Thermo Scientific/Thermo
Fisher Scientific, Waltham, USA

Stereomikroskop MS5

Leica, Wetzlar

Stickstofftank: Espace 331 Gaz

Air Liquide, Paris, Frankreich

Transferpette®-12, 30-300 µl

Brand, Wertheim

Wärme- und Trockenschrank, ED115

Binder, Tuttlingen

Wasserbad

Gesellschaft für Labortechnik,
Burgwedel

Zählkammer Neubauer improved

Carl Roth, Karlsruhe

Zentrifugen

- Varifuge 3.0 R
- Centrifuge 5418 R

Heraeus, Hanau
Eppendorf, Hamburg

2.9 Software

AID EliSpot Software Version 6.x

Advanced Imaging Devices,
Strassberg

CFX Manager

BioRAD, Hercules, USA

GraphPad Prism 7

GraphPad Software, La Jolla,
USA

Skant RE for Varioskan Flash 2.4.5

Thermo Fisher Scientific,
Waltham, USA

SPSS 22

IBM Corporation, Armonk, USA

3. Methoden

3.1 Studienteilnehmer

Es wurden 51 MS-Patienten im Alter von 19 bis 68 Jahren eingeschlossen. Vier Patienten davon wurden zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten in verschiedenen Situationen der Krankheitsaktivität (aktiv/inaktiv) getestet. Somit wurden 26 Blutproben von Patienten mit aktiver Erkrankung und 29 Blutproben von Patienten mit inaktiver Erkrankung untersucht.

Im Fall, dass ein akuter Schub vorlag, der mit einer Glukokortikoidpulstherapie behandelt wurde, wurde das Blut vor der Steroidgabe abgenommen. Die Patienten wurden anhand der oben beschriebenen diagnostischen Kriterien von Lublin (Lublin et al. 2014) klinisch charakterisiert. Die klinische Charakterisierung sowie Daten wie Geschlecht, Alter, Krankheitsdauer, Liquorbefund, Medikation und Neben-erkrankungen sind im Anhang in Tabelle 5 dargestellt.

Als Kontrollpersonen dienten 13 gesunde Probanden und 5 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen im Alter von 18 bis 57 Jahren, die im Anhang in Tabelle 6 dargestellt werden.

Das Durchschnittsalter betrug 41,3 Jahre bei den MS-Patienten und 35,8 Jahre bei den Kontrollpersonen.

Die Studie wurde auf Antrag von Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Weißert von der Ethikkommission der Universität Regensburg gebilligt (Aktenzeichen: 12-101-0004).

3.2 Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Bluts

3.2.1 Aufreinigung von mononukleären Zellen des peripheren Bluts

Pro Patient oder Kontrollperson wurden 100 ml venöses Blut in mit Natrium-Heparin beimpften Perfusorspritzen abgenommen. Für jeden Patienten wurden zudem ein Blutbild und ein Differentialblutbild bestimmt. Die Aufreinigung der mononukleären Zellen erfolgte unmittelbar nach Blutentnahme, um eine durch verzögerte Aufarbeitung bedingte verminderte Funktionalität in nachfolgenden Versuchen zu vermeiden (Bull et al. 2007).

Zur Aufreinigung der PBMZ wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, in der PBMZ und andere Blutkomponenten unter Ausnutzung von Dichteunterschieden separiert werden. Die Methode wurde von Arne Boyum entwickelt (Boyum 1964) und nutzt ein Dichtegradientenmedium (wie Lymphoprep, das in der vorliegenden Arbeit

verwendet wurde), bestehend aus Natriumdiatrizoat, Polysacchariden und Wasser bei einer definierten Dichte von 1,077 g/ml, zur Auftrennung der Blutkomponenten. Erythrozyten und Granulozyten haben eine höhere Dichte als dieses Trennmedium und setzen sich nach Zentrifugation am Röhrchenboden ab, während PBMZ eine geringere Dichte als das Medium aufweisen und somit über der Lymphoprep-Phase zu finden sind. Wiederum darüber bildet sich eine Schicht noch geringerer Dichte bestehend aus Plasma und Thrombozyten.

Die Aufreinigung erfolgte wie bereits zuvor beschrieben (Riedhammer et al. 2016). Im ersten Schritt der Aufreinigung wurde das Blut in Zellkulturflaschen mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt. In 50 ml-fassenden Röhrchen wurden je 15 ml Lymphoprep vorgelegt. Diese wurden dann vorsichtig mit je 30 ml der Blutverdünnung überschichtet, ohne die verschiedenen Phasen zu vermischen, indem ein die Blutverdünnung enthaltendes Röhrchen und das Lymphoprep enthaltende Röhrchen in eine annähernd waagrechte Position gebracht wurden und die Blutverdünnung vorsichtig über das Lymphoprep geschüttet wurde. Die überschichteten Röhrchen wurden dann bei 18°C für 25 Minuten bei 670 x g ohne Bremse zentrifugiert. Mittels Transferpipetten wurde dann die entstandene wolkig aussehende PBMZ-enthaltende Schicht oberhalb der Lymphoprep-Phase abgenommen, in neuen Röhrchen gesammelt und mit PBS verdünnt. Nun wurden die Zellen zwei Mal bei Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 160 x g gewaschen. Die Überstände wurden abdekantiert und die am Boden der Röhrchen entstandenen Zellpellets in RPMI resuspendiert und schließlich auf Eis gestellt.

3.2.2 Zählen von mononukleären Zellen des peripheren Bluts

Die in Zellmedium resuspendierten PBMZ wurden nun je nach zu erwartender Zellzahl 16- oder 32-fach mit 0,4% Trypanblau und gegebenenfalls auch mit Türkscher Lösung verdünnt. Die Färbung mit Trypanblau dient der Ermittlung der Anzahl lebender Zellen: Zellen mit intakter Zellmembran nehmen die Farbe nicht auf und erscheinen unter dem Lichtmikroskop hell, während Trypanblau die Zellmembran toter Zellen passiert und deren Zytoplasma blau färbt (Strober 2001). Jedoch kann die Färbung mit Trypanblau lebende Erythrozyten, mit denen die PBMZ-Schicht verunreinigt sein kann, nicht von mononukleären Zellen differenzieren. Um leichte Verunreinigungen der PBMZ-Schicht des Gradienten mit Erythrozyten festzustellen oder auszuschließen, kam eine Färbung mit Türkscher Lösung zum Einsatz, die Erythrozyten zerstört. Allerdings sind lebende

und tote Zellen unter dem Lichtmikroskop nur bedingt voneinander unterscheidbar. Durch Verwendung beider Färbungen lässt sich jedoch die Zahl lebender mononukleärer Zellen ermitteln. Zum Zählen der gewonnenen Zellen wurde anschließend eine so genannte Neubauer-Zählkammer genutzt. Dazu wurden 10 µl der mit Trypanblau oder Türkscher Lösung verdünnten PBMZ-Lösung in die Zählkammer appliziert. Die zentrale Fläche dieses Hämocytometers besteht aus neun Großquadraten von je 1mm² bei einer Höhe von 0,1 mm, so dass sich ein Volumen von 0,1 mm³ entsprechend 10⁻⁴ ml ergibt. Die vier Großquadrate in den Ecken sind wiederum zur Erleichterung des Zählens in 16 kleinere Quadrate unterteilt. Es wurde die Zellzahl in den vier Eck-Quadraten gezählt und folgendermaßen auf die ursprüngliche Konzentration rückgerechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl in vier äußeren Großquadraten}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktoren} \times 10^4$$

3.2.3 Einfrieren von mononukleären Zellen des peripheren Bluts

Die gelösten PBMZ wurden nun entweder direkt im Anschluss für weitere Versuche genutzt und/oder zur späteren Verwendung eingefroren. Zum Einfrieren wurden die PBMZ durch Verdünnung mit Zellmedium auf eine Konzentration von 10⁷ PBMZ/ml gebracht. Dann wurde ein gleiches Volumen an Einfriermedium in drei Schritten jeweils im Abstand von drei bis vier Minuten zugegeben, so dass eine Konzentration von 5x10⁶ PBMZ/ml erreicht wurde. Die Zellen wurden sofort nach der letzten Zugabe von Einfriermedium dann in Aliquoten zu je 1 ml à 5x10⁶ PBMZ in Cryovials zunächst auf -80°C eingefroren, um nach wenigen Tagen in einen Stickstofftank mit Temperaturen von etwa -170°C überführt zu werden.

3.2.4 Auftauen von mononukleären Zellen des peripheren Bluts

Bei Verwendung der PBMZ für Versuche zu einem späteren Zeitpunkt wurden diese wieder folgendermaßen aufgetaut: Zunächst wurde RPMI-Medium in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von warmem RPMI-Medium oder durch Erwärmen im Wasserbad aufgetaut und möglichst schnell mit RPMI-Medium verdünnt, um eine schnelle Reduktion der DMSO-Konzentration zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben zwei Mal für je 10 Minuten bei 160 x g mit RPMI gewaschen und durch Resuspension in Zellmedium in die gewünschte Konzentration gebracht.

3.3 Auswahl der Peptide für ELISpot Assays

Von den von Fissolo et al. eluierten Peptide wurden elf der 191 von MHC-II eluierten Peptide, ein Peptid, das in zwei Teilen von MHC-II-Molekülen eluiert wurde, und drei der 118 von MHC-I eluierten Peptide ausgewählt. Die Peptide, ihre Sequenzen, ihre Assoziation mit HLA-Molekülen und die Krankheitstypen der jeweiligen Autopsiespender sind in Tabelle 1 dargestellt. Teilweise waren zusätzlich zu den hier getesteten Peptiden in ihrer Sequenz ähnliche Peptide eluiert worden, die zur Ergänzung ebenfalls aufgeführt werden. Wichtige Auswahlkriterien stellten dabei die vorherige Beschreibung des Antigens als Autoantigen, die Elution des gleichen Peptids von unterschiedlichen Autopsieproben oder unterschiedlichen HLA-Molekülen dar.

Zusätzlich zu den eluierten Peptiden wurden fünf weitere Peptide zum Vergleich ausgewählt (siehe Tabelle 2). Die Entscheidung fiel auf zwei von MBP abgeleitete Peptide, von denen zuvor eine mögliche Relevanz in der Erkrankung gezeigt worden war (De Graaf et al. 1999, Krogsgaard et al. 2000). Außerdem wurden ein von *Chlamydia pneumoniae* abgeleitetes Peptid getestet, das in einem Tiermodell EAE induzieren konnte (Lenz et al. 2001), sowie von Tetanus Toxoid und JC-Virus abgeleitete Peptide, die nachweislich auf verschiedenen HLA-Molekülen präsentiert werden können (Panina-Bordignon et al. 1989) bzw. unter anderem auf dem mit MS assoziierten HLA-DRB1*1501 (Aly et al. 2011) und somit eine positive Reaktion in den meisten Probanden erwarten ließen.

Da sieben der 20 insgesamt getesteten Peptide vom Myelinprotein MBP stammen, zeigt Abbildung 8 zur besseren Übersicht deren Lage innerhalb des Proteins.

Tabelle 1: Getestete eluierte Peptide

Name	Sequenz	Assoziierte HLA-Moleküle	Gefunden in MS-Subtyp	Ähnliche Sequenzen, deren Assoziation mit HLA-Typ und MS-Subtyp	Häufigkeit in Autopsie-Proben (inklusive ähnlichen Sequenzen)
Aktin	WISKQEYDESGPSIVHRK	DRB1*1501 DRB1*0101 DRB1*0301	PP-MS SP-MS Unklarer Subtyp	WISKQEYDESGPSIVHR assoziiert mit DRB1*0401 (SP-MS) WISKQEYDESGPSIVHRKCF auf DRB1*0301 (SP-MS)	5/8 (7/8)
Alpha-Synuclein	YEMPSEEGYQD	DRB1*0101	SP-MS	-----	1/8
GFAP ₃₇₅₋₃₈₄	NRITIPVQTF	Cw*07	PP-MS SP-MS	-----	3/8
GFAP ₃₈₉₋₄₀₀	IRETSLDTKSVS	DRB1*1501	SP-MS	GFAP ₃₈₈₋₃₉₈ (QIRETSLDTKS) assoziiert mit DRB1*0301 (unklarer MS-Typ)	1/8 (2/8)
Glutamat-Dehydrogenase	KVYNEAGVTFT	DRB1*1501	SP-MS	-----	1/8

Name	Sequenz	Assoziierte HLA-Moleküle	Gefunden in MS-Subtyp	Ähnliche Sequenzen, deren Assoziation mit HLA-Typ und MS-Subtyp	Häufigkeit in Autopsie-Proben (inklusive ähnlichen Sequenzen)
Glutamin-Synthetase	LNETHGDEPFQYKN	DRB1*0301 DRB1*0101 DRB1*0301 DRB1*1501	SP-MS unklarer Subtyp	NETGDEPFQYKN assoziiert mit DRB1*0301 (SP-MS)	5/8 (6/8)
MBP ₁₀₋₂₇	RHGSKYLATASTMDHARH	DRB1*1501	SP-MS	HGSKYLATASTMDHA assoziiert mit DRB1*1501 (SP-MS)	1/8 (2/8)
MBP ₈₄₋₉₄	DENPVVHFFKN	DRB1*0401 DRB1*1501	SP-MS	-----	2/8
MBP ₉₅₋₁₁₀	IVTPRTPPPSQGKGRG	DRB1*1501	SP-MS	MBP ₉₅₋₁₀₆ (IVTPRTPPPSQG) auf DRB1*0401 (SP-MS) und DRB1*0101 (SP-MS) MBP ₉₆₋₁₁₁ (VTPRTPPPSQGKGRGL) auf DRB1*0101 (unklarer Subtyp)	2/8 (4/8)

Name	Sequenz	Assoziierte HLA-Moleküle	Gefunden in MS-Subtyp	Ähnliche Sequenzen, deren Assoziation mit HLA-Typ und MS-Subtyp	Häufigkeit in Autopsie-Proben (inklusive ähnlichen Sequenzen)
MBP ₁₃₉₋₁₅₃	HKGFKGVDAQGTL	DRB1*1501	SP-MS	-----	1/8
NF-L	DLSQVAAISNDLK	Keine Assoziation, MHC-I-Restriktion	SP-MS	-----	2/8
NF-3 (von NF-M)	IIEETKVEDEK	DRB1*1501	SP-MS	EIIEETKVEDEK assoziiert mit DRB1*0301 (SP-MS)	1/8 (2/8)
S100	ELINNELSHF	A*25	PP-MS	-----	1/8
Survivin	RAIEQLAMM	DRB1*1501	PP-MS	-----	1/8
Weiteres getestetes Peptid					
MBP ₈₄₋₁₁₂	DENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQQKGRGLS	In zwei Teilen (MBP ₈₄₋₉₄ und MBP ₉₅₋₁₁₂) eluiert Assoziation mit DRB1*1501			

Tabelle 2: Getestete Kontrollpeptide

Name/Ursprung des Peptids	Sequenz	Referenz
MBP ₈₉₋₁₀₁	VHFFKNIVTPRTP	De Graaf et al. 1999
MBP ₈₅₋₉₉	ENPVVHFFKNIVTPR	Krogsgaard et al. 2000
Tetanus toxoid (tt830-844)	QYIKANSKFIGITEL	Panina Bordignon et al. 1989
Chlamydia pneumoniae (Cpn0483)	RFPNHYGCLLPNPRTEQDN	Lenz et al. 2001
JC virus (VP1 34-48)	VDSITEVECFLTPEM	Aly et al. 2011

3.4 Peptidsynthese und Lagerung

Die verwendeten Peptide wurden in aufgereinigter Form bezogen, ihre Reinheit wurde vom Hersteller mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie überprüft worden und betrug im Mittel 97,5% (bei Werten zwischen 90,0% und 99,8%). Die kryophilisierten Peptide wurden durch Lösung in DMSO auf eine Konzentration von 4 mg/ml gebracht und bei -20°C gelagert.

3.5 ELISpot Assay

ELISpot^{PRO} Kits wurden zur Detektion von IFN- γ -produzierenden PBMZ genutzt. Die Versuche wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die im Kit enthaltenen ELISpot-Platten waren bereits vorab vom Hersteller mit dem monoklonalen Antikörper mAb 1-D1K, der sich gegen humanes IFN- γ richtet, gecoatet worden. Die Platten wurden somit im ersten Schritt zuerst vier Mal mit je 200 μ l PBS pro Loch gewaschen und anschließend für mindestens eine Stunde mit 200 μ l FBS-enthaltendem Zell-Medium pro Loch bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der gegen IFN- γ gerichteten Antikörper zu blockieren. Anschließend wurden pro Loch 2×10^5 PBMZ und die jeweiligen Antigene hinzugegeben. Für jedes Antigen wurden Doppelwerte gemessen. Es wurden die oben genannten 20 Peptide in Konzentrationen zu 3 μ g/ml getestet, die kurz zuvor aufgetaut wurden. Diese Konzentration hatte in Vorexperimenten der Arbeitsgruppe die beste Nachweisbarkeit von IFN- γ -sezernierenden Zellen nach Stimulation mit Peptiden ergeben (nicht

publizierte Daten). Als Negativkontrollen dienten vier Zellsuspension enthaltende Löcher ohne weitere Zusätze und je zwei Löcher, in denen DMSO in der gleichen Verdünnung wie die in DMSO gelösten Peptide zugegeben wurden. Als positive Kontrollantigene wurden Tetanus Toxoid bei einer Konzentration von 0,3 µg/ml und Phytohämagglutinin (PHA) in der Konzentration von 3 µg/ml verwendet. Die Konzentrationen der beiden Positivkontrollen waren zuvor in Titrationsexperimenten ermittelt worden. Nach Zugabe der jeweiligen Antigene wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in den Löchern gemischt. Die Platten wurden anschließend in Aluminiumfolie gewickelt, um Verdampfungseffekte zu vermeiden, und in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ für 48 Stunden inkubiert. Während der Inkubationszeit konnte von den PBMZ gebildetes IFN-γ an die auf der Platte gebundenen gegen IFN-γ gerichteten Antikörper binden. Nach 48 Stunden wurden zunächst pro Loch 100 µl Zellüberstände für mögliche spätere weitere Analysen abgenommen und bei -80°C eingefroren. Der übrige Loch-Inhalt wurde verworfen und die Platte fünf Mal mit je 200 µl PBS pro Loch gewaschen.

Das gebundene IFN-γ wurde nun entweder mittels einem HRP- (*horseradish peroxidase*/Meerrettichperoxidase) oder einem ALP- (alkalische Phosphatase) basierten Detektionssystem visualisiert. Dazu wurde ein mit HRP bzw. ALP gekoppelter Antikörper gegen IFN-γ zunächst 1:200 mit gefiltertem, 0,5% FBS-enthaltendem PBS verdünnt. Nach fünfmaligem Waschen der Platte mit 200 µl PBS pro Loch wurden dann 100 µl der Antikörperverdünnung pro Loch zupipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte erneut fünf Mal mit PBS gewaschen und dann das Substrat für das jeweilige Enzym zugegeben, im Fall von ALP BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat/Nitroblautetrazolium), im Fall von HRP TMB (Tetramethylbenzidin), so dass sich umschriebene Spots um die IFN-γ-sezernierenden Zellen bildeten. Die Farbreaktion wurde standardmäßig nach sieben bis acht Minuten durch intensives Waschen der Platte mit Leitungswasser gestoppt. Die Platten wurden nun im Dunkeln getrocknet.

3.6 ELISpot Auswertung

Die ELISpot-Platten wurden an einem AID-ELISpot-Reader mit der AID-ELISpot-Software Version 6.x ausgewertet.

Als Spot wurde dabei gewertet, was eine bestimmte Größe, Intensität und einen bestimmten Gradienten (also eine von innen nach außen abnehmende Farbtintensität

entsprechend der mit zunehmendem Abstand von der produzierenden Zelle abnehmenden IFN- γ -Konzentration) erreichte. Artefakte, die vom System als Spots mitgezählt wurden, wurden manuell entfernt. Zum Vergleich wurden auch alle ELISpot-Platten unter dem Lichtmikroskop gezählt.

Die Zahl der spezifischen IFN- γ -sezernierenden Zellen wurde ermittelt, indem die erhaltene Spotzahl in Kontroll-Löchern von den Spotzahlen in antigenstimulierten Löchern abgezogen wurde. Im Fall, dass sich dabei ein negativer Wert ergab, wurde die Spotzahl auf Null gesetzt. Als positive Peptide wurden diejenigen gewertet, bei denen die mittlere Spotzahl in antigenstimulierten Löchern die mittlere Spotzahl in Kontrolllöchern plus zwei Standardabweichungen überstieg.

3.7 ELISpot und ELISA zum Vergleich der Sensitivität der beiden Assays

Um die Sensitivität von ELISpot und ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) zum Nachweis einer IFN- γ -Produktion bzw. der Zahl IFN- γ -sezernierender Zellen zu vergleichen, wurde ein ELISpot durchgeführt, dessen Zellüberstände anschließend in einem ELISA weiter untersucht wurden. PBMZ von vier MS-Patienten und vier Kontrollpersonen wurden mit verschiedenen PHA-Konzentrationen (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,3 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ und 3 $\mu\text{g/ml}$) und reinem RPMI-Zellmedium inkubiert. Es wurden jeweils Doppelwerte gemessen. Nach 48 Stunden wurden pro Loch 100 μl Zellüberstand abgenommen und zunächst bei -80°C eingefroren. Der ELISpot-Versuch wurde wie oben beschrieben weitergeführt und entwickelt.

Zum Vergleich der Sensitivität des ELISpot-Assays mit dem ELISA wurde in der Folge ein ELISA zum Nachweis von in den Zellüberständen befindlichem IFN- γ durchgeführt. Dazu wurde das Kit „Human IFN- γ ELISA Ready Set Go!“ von eBioscience verwendet. Der Versuch wurde gemäß den Angaben des Herstellers ausgeführt. Zunächst wurde der enthaltene Puffer zum Beschichten (Coating) der Platte 1:10 mit Reinstwasser verdünnt und der gegen humanes IFN- γ gerichtete Coating-Antikörper 1:250 wiederum mit dem verdünnten Puffer verdünnt. Eine im Kit enthaltene Corning Costar Platte wurde mit 100 μl pro Loch dieser Antikörperverdünnung versehen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die folgenden Inkubationszeiten wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Platte wurde dann fünf Mal mit 250 μl pro Loch 0,05% Tween enthaltendem PBS gewaschen. Die im Set enthaltene ELISA/ELISPOT Stammlösung, eine FBS-enthaltende Phosphat-gepufferte Lösung, wurde dann wie vorgegeben 1:5 zur weiteren Verwendung mit ultrareinem Wasser verdünnt und die Platte mit 200 μl

pro Loch mit dieser Lösung für eine Stunde geblockt. Als Standard dienendes lyophilisiertes humanes IFN- γ wurde wie gefordert in ultrareinem Wasser rekonstituiert und mit ELISA/ELISPOT-Verdünnungslösung auf eine Konzentration von 500 pg/ml gebracht, und anschließend sechs Mal weiter verdünnt, so dass sich eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml und 7,8 pg/ml ergab. Als Leerwerte diente ELISA/ELISPOT-Verdünnungslösung ohne Zusätze. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Platte mit je 100 μ l Standardverdünnung, Zellüberstand oder ELISA/ELISPOT-Verdünnungslösung pro Loch für zwei Stunden inkubiert. Es folgten fünf Waschschriffe und die Zugabe von 100 μ l Verdünnungslösung, die einen biotinylierten gegen humanes IFN- γ gerichteten Antikörper enthielt. Nach einer Stunde Inkubationszeit und fünf weiteren Waschschriffen wurden 100 μ l pro Loch einer an Avidin gekoppelten Meerrettichperoxidase (Avidin-HRP)-enthaltenden Verdünnungslösung zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Avidin bindet in diesem Schritt an das Antikörper-gebundene Biotin und die an Avidin gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert im nächsten Schritt die Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blau gefärbten TMB-Diimin. Nach sieben Waschschriffen wurden nun 100 μ l pro Loch einer TMB-Lösung zugegeben. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 1M H₂SO₄ gestoppt, was zu einem Farbumschlag von blau nach gelb führte. Die Platte wurde bei 450 nm an einem Varioskan Flash-Gerät abgelesen.

3.8 HLA-Typisierung auf HLA-DRB1*1501

Die HLA-Typisierung wurde von Frau Dagmar Halbritter (medizinisch-technische Assistentin) durchgeführt.

Zunächst wurde aus 400 μ l EDTA-Vollblut DNA unter Verwendung des innuPREP Blood DNA Mini Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden zunächst zur Lyse des Ausgangsmaterials in einem 1.5 ml Röhrchen zu 400 μ l EDTA-Vollblut 400 μ l Lyse-Puffer (Lysis Solution SLS) und 30 μ l Proteinase K hinzugefügt, gut durchmischt und für zehn Minuten bei 60°C inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde 700 μ l Binde-Puffer (Binding Solution BL) zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nun erfolgte das Binden der DNA an die in einer Zentrifugationssäule enthaltene Membran. Dazu wurden zunächst 750 μ l der erhaltenen Lösung auf eine in ein Sammelröhrchen gegebene Zentrifugationssäule pipettiert. Nach Zentrifugation bei 11.000 x g für eine Minute wurde das

Sammelröhrchen mit dem Filtrat verworfen und die Zentrifugationssäule in ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Nun wurde der Rest der erhaltenen Lösung auf die Zentrifugationssäule pipettiert und erneut bei 11.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Zum Waschen der gebundenen DNA wurde das Sammelröhrchen mit dem Filtrat verworfen, die Zentrifugationssäule in ein neues Sammelröhrchen gesetzt, 400 µl Wasch-Puffer (Washing Solution C) zupipettiert und bei 11.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Dieses Vorgehen wurde dann weitere zwei Mal durch Zupipettieren von 600 µl Wasch-Puffer (Washing Solution BS) wiederholt. Die Zentrifugationssäule in einem neuen Sammelröhrchen wurde dann bei maximaler Geschwindigkeit für drei Minuten zentrifugiert, um eventuelle Ethanolreste zu eliminieren, das Sammelröhrchen verworfen und die Zentrifugationssäule in ein Elutionsröhrchen gesetzt, um die gebundene DNA nun wieder zu eluieren. Dazu wurden in zwei Schritten zuerst 100 µl, dann 50 µl auf 60°C vorgewärmter Elutionspuffer zupipettiert, bei Raumtemperatur für jeweils zwei Minuten inkubiert und für eine Minute bei 11.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Im Anschluss wurden der A260/280-Quotient bestimmt und die Konzentration der DNA gemessen.

Die Genotypisierung des MS-assoziierten Allels HLA-DRB1*1501 wurde dann wie zuvor durch Goris et al. (Goris et al. 2008) beschrieben durch TaqMan-basierte PCR durchgeführt. Zunächst wurde die erhaltene gDNA durch Verdünnung mit Wasser auf eine Konzentration von 50 ng pro 2 µl eingestellt. Pro Loch der PCR-Platte wurde dann unter Kühlung ein Gemisch aus 10 µl TaqMan Universal PCR Master-Mix, je 2 µl des Vorwärts- und Rückwärtsprimers, sowie je 1 µl der Sonden und 2 µl Wasser zupipettiert, so dass im Anschluss eine Primer-Endkonzentration von 450 nM und eine Sonden-Endkonzentration von 100 nM erreicht wurden. Anschließend wurden 2 µl der gDNA-enthaltenen Probe zugegeben und die Platte mit Folie versiegelt und kurz zentrifugiert.

Es wurden jeweils Doppelwerte gemessen. Als Negativkontrollen dienten je zwei Löcher mit DNase-freiem Wasser statt der DNA-Probe.

Die Polymerasekettenreaktion wurde dann mit einem CFX96-Echtzeitsystem durchgeführt. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet:

1. 50°C, 2:00 Min. (UNG-Aktivität zur Vermeidung von "carry-over"-Kontaminationen)
2. 95°C, 10:00 Min. (Inkubation zur Aktivierung der DNA-Polymerase)
3. 95°C, 0:15 Min. (Denaturierung)
4. 58°C, 1:00 Min. (Annealing, Extension)

Es wurden insgesamt 70 Zyklen der Schritte 3 und 4 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anschließend mithilfe der zugehörigen Software CFX-Manager.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Software SPSS Statistics 22 vorgenommen. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Kolmogorow-Smirnow- und Shapiro-Wilk-Test getestet. Bei nicht normalverteilten Daten wurden Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der verschiedenen Gruppen angewandt. Bei normalverteilten Daten wurde der T-Test zum Vergleich der Mittelwerte angewandt. P-Werte kleiner oder gleich $p = 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Wenn multiple Vergleiche durchgeführt wurden, wurde der erhaltene p-Wert in den Einzelvergleichen mit der Zahl der parallelen Vergleiche multipliziert (Bonferroni-Methode). Die Abbildungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 7 erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Vergleich der Sensitivität von ELISA und ELISpot

PBMZ von vier MS-Patienten und vier Kontrollpersonen wurden in einem IFN- γ -ELISpot mit PHA-Konzentrationen zu 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,3 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ und 3 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert. Im ELISpot-Versuch zeigte sich wie in Abbildung 1 dargestellt ein mit steigender PHA-Konzentration titrierbarer Anstieg der Spotzahlen als Maß für die Zahl der spezifischen IFN- γ -produzierenden PBMZ bis zu einer Zahl von 59,7 pro 10^5 PBMZ IFN- γ -produzierenden Zellen nach Stimulation mit 3 $\mu\text{g/ml}$ PHA. Dagegen konnte im korrespondierenden ELISA keine IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden.

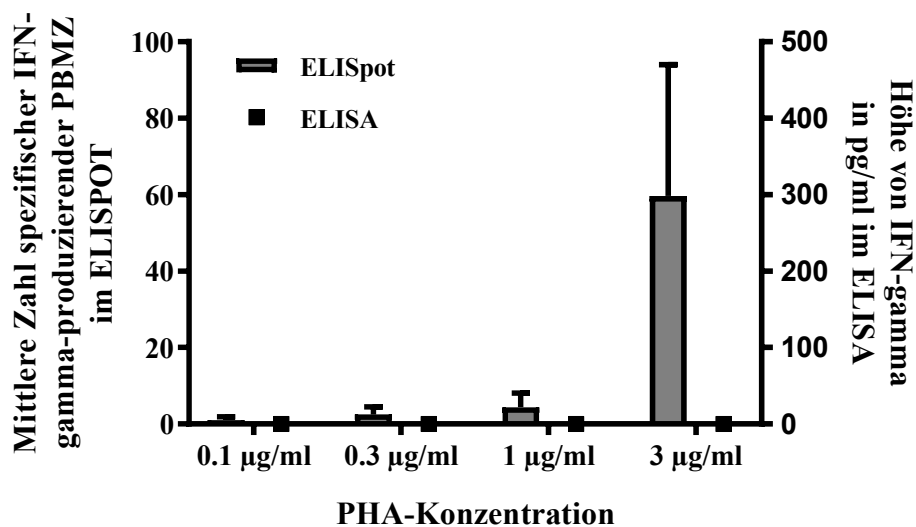


Abbildung 1: Vergleich des IFN- γ - Nachweises in ELISpot und ELISA

Dargestellt sind die mittleren Zahlen spezifischer IFN- γ -produzierender PBMZ pro 10^5 eingesetzten PBMZ (mit Standardabweichungen) im ELISpot-Assay links gegenüber der im ELISA nachgewiesenen Höhe von IFN- γ rechts nach Stimulation mit steigenden PHA-Konzentrationen. Es zeigen sich mit steigender PHA-Konzentration steigende Spot-Zahlen im ELISpot, während im ELISA kein IFN- γ nachgewiesen werden kann.

Die Überprüfung der Standardreihe des ELISA, dargestellt in Abbildung 2, mit humanem IFN- γ in einer von 500 pg/ml bis 7,08 pg/ml reichenden 1:2-Verdünnungsreihe hingegen erbrachte eine mit der Konzentration des Standards linear ansteigende optische Dichte, hinweisend auf eine volle Funktionalität des Versuchs.

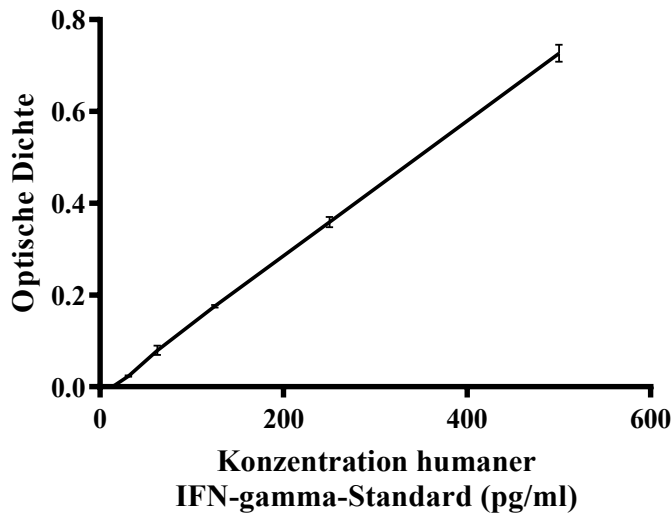


Abbildung 2: Standardreihe IFN- γ ELISA

Dargestellt ist die im ELISA gemessene mittlere optische Dichte mit Standardabweichung, sofern vorhanden, bei Applikation einer von 7,08 bis 500 pg/ml Standard-Verdünnungsreihe mit humanem IFN- γ .

4.2 Spontan IFN- γ -sezernierende PBMZ

In den durchgeführten IFN- γ -ELISpot-Versuchen dienten PBMZ-enthaltende Löcher, die nur mit dem zum Lösen der Peptide verwendeten DMSO versetzt wurden, zur Bestimmung der spontan IFN- γ -sezernierenden PBMZ. Gemäß dem Kolmogorow-Smirnow- und Shapiro-Wilk-Test zeigten sich die Daten für die MS-Patienten in beiden Tests nicht normalverteilt ($p < 0,05$), für die Kontrollpersonen ergab sich nur im Kolmogorow-Smirnow-Test ein Wert von $p > 0,05$. Somit werden die Ergebnisse in nicht-parametrischer Form dargestellt. Mit den im Folgenden dargestellten Daten wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren. Die medianen Frequenzen dieser PBMZ betragen 2,63 pro 10^5 PBMZ bei den Kontrollpersonen und 3,00 pro 10^5 PBMZ bei allen MS-Patienten (kein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test). Bei Patienten mit inaktiver MS-Erkrankung zeigten sich 4,00 pro 10^5 PBMZ, bei Patienten mit aktiver MS 2,38 pro 10^5 PBMZ ($p = 0,039$, Mann-Whitney-U-Test nach Bonferroni-Korrektur), der Vergleich der MS-Untergruppen mit den Kontrollpersonen zeigte jeweils kein signifikantes Ergebnis.

4.3 Spezifische IFN- γ -sezernierende Zellen gegen eluierte Peptide von MS-Patienten und Kontrollpersonen im Vergleich

Elf von MHC-II, drei von MHC-I und ein zusammengesetztes in zwei Teilen eluiertes Peptid (MBP₈₄₋₁₁₂) wurden als Antigene in der Konzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ in IFN- γ -ELISpots getestet. Die Zahl spezifischer IFN- γ -produzierender PBMZ wurde ermittelt, indem die mittlere Spotzahl in Kontroll-Löchern nur mit DMSO-Zusatz von den Spotzahlen der mit Antigen stimulierten Löcher subtrahiert wurde. Als erstes Ergebnis zeigt sich, dass die Peptide sowohl bei Kontrollpersonen als auch bei MS-Patienten zu einer IFN- γ -Sekretion durch spezifische PBMZ führten.

Nun wurden die Zahlen spezifischer IFN- γ -produzierender PBMZ zwischen der Gruppe aller MS-Patienten und der Kontrollgruppe, bestehend aus Normalpersonen und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen, verglichen. Dabei wurden die Summen der spezifischen Spotzahlen in Reaktion auf alle direkt eluierten Peptide gebildet. MBP₈₄₋₁₁₂ wurde in dieser Auswertung nicht berücksichtigt, da es als Ganzes nicht direkt eluiert worden war und mit den eluierten berücksichtigten Peptiden MBP₈₄₋₉₄ und MBP₉₅₋₁₁₀ überlappt.

Die Daten zeigten sich wiederum mit der Ausnahme eines $p > 0,05$ bei den Normalpersonen im Kolmogorow-Smirnow-Test nicht normalverteilt und werden nichtparametrisch dargestellt. In der Gruppe der MS-Patienten fand sich eine mediane Frequenz IFN- γ -produzierender PBMZ in Reaktion auf alle 14 direkt eluierten Peptide von 7,25 pro 10^5 PBMZ. Die mediane Frequenz in der Gruppe der Kontrollpersonen zeigte sich mit 5,88 pro 10^5 PBMZ nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,465$, Mann-Whitney-U-Test). Abbildung 3 zeigt die Daten als Dotplot.

Die Zahl der spezifischen IFN- γ -produzierenden PBMZ teilte sich in der Gruppe der MS-Patienten im Median in 6,00 pro 10^5 PBMZ in Reaktion auf von MHC-II eluierte Peptide und in 1,25 pro 10^5 PBMZ in Reaktion auf von MHC-I eluierte Peptide auf. In der Kontrollgruppe hingegen fanden sich 4,50 pro 10^5 PBMZ in Reaktion auf von MHC-II eluierte Peptide und 1,75 pro 10^5 PBMZ in Reaktion auf von MHC-I eluierte Peptide. Auch hier blieb der Vergleich zwischen MS-Patienten und Kontrollpersonen nicht signifikant ($p = 0,299$ für von MHC-II eluierte Peptide, $p = 0,907$ für von MHC-I eluierte Peptide, Mann-Whitney-U-Tests). Die Testung des aus zwei eluierten Peptiden zusammengesetzten MBP₈₄₋₁₁₂-Peptids ergab eine mediane Zahl IFN- γ -

produzierender PBMZ von 0,50 pro 10^5 PBMZ bei MS-Patienten im Vergleich zu von 0,75 pro 10^5 PBMZ bei Kontrollpersonen ($p = 0,384$, Mann-Whitney-U-Test).

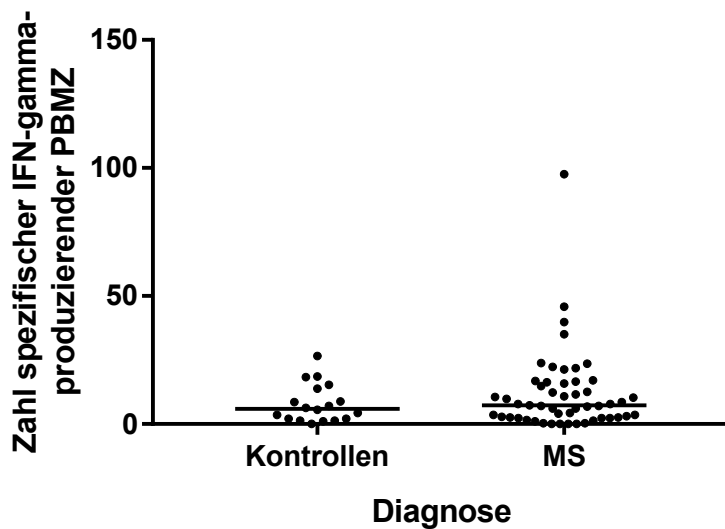


Abbildung 3: Spezifische IFN- γ -produzierende Zellen in MS-Patienten und Kontrollpersonen nach Stimulation mit eluierten Peptiden

Gezeigt sind die Zahlen spezifischer IFN- γ -produzierender Zellen pro 10^5 PBMZ nach Stimulation mit allen 14 getesteten direkt eluierten Peptiden in MS-Patienten und Kontrollpersonen im Vergleich. Die Darstellung als Dotplot erlaubt die Abbildung jedes individuellen Ergebnisses. Zusätzlich sind die Mediane beider Gruppen dargestellt. Die medianen Zahlen spezifischer IFN- γ -produzierender Zellen unterscheiden sich in den beiden Gruppen nicht signifikant ($p = 0,465$, Mann-Whitney-U-Test).

4.4 Spezifische IFN- γ -sezernierende Zellen in aktiver und inaktiver MS

Nun wurde die Gruppe der MS-Patienten aufgegliedert in Patienten mit aktiver und inaktiver Erkrankung. Auch innerhalb dieser Gruppen zeigte sich keine Normalverteilung der Zahlen spezifischer IFN- γ -produzierender PBMZ.

Gegen alle 14 getesteten eluierten Peptide fanden sich bei der Gruppe der Patienten mit aktiver MS im Median 11,5 spezifische IFN- γ -produzierende Zellen pro 10^5 PBMZ gegenüber 3,50 Zellen pro 10^5 PBMZ bei Patienten mit inaktiver MS ($p = 0,021$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur). Die Vergleiche zwischen Patienten mit aktiver MS und Kontrollpersonen ($p = 0,216$) und zwischen inaktiver MS und Kontrollpersonen ($p = 1$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Daten sind als Dotplot graphisch in Abbildung 4 dargestellt.

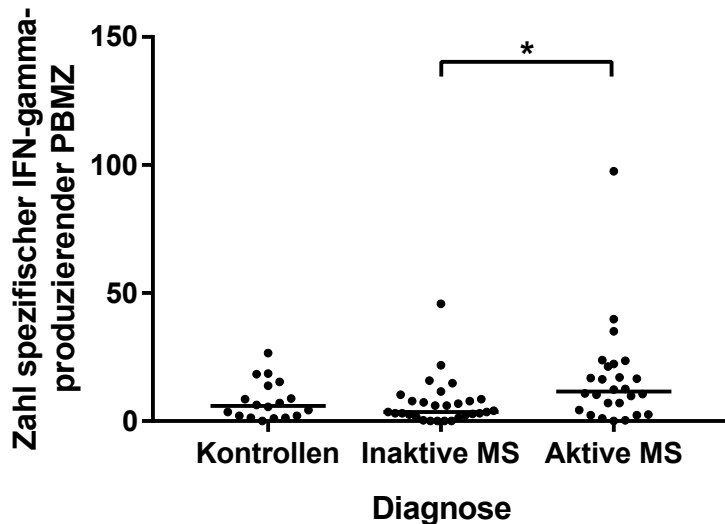


Abbildung 4: Spezifische IFN- γ -produzierende Zellen in Patienten mit aktiver und inaktiver MS und Kontrollpersonen nach Stimulation mit eluierten Peptiden

Die Abbildung zeigt wiederum die Zahlen spezifischer IFN- γ -produzierender Zellen pro 10^5 PBMZ nach Stimulation mit allen 14 getesteten direkt eluierten Peptiden, nun mit Aufteilung der Gruppe der MS-Patienten in aktive und inaktive Erkrankungsfälle und Kontrollpersonen im Vergleich. In den Gruppen der Patienten mit aktiver und inaktiver MS-Erkrankung ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,021$, Mann-Whitney-U-Test).

4.4.1 Reaktionen gegen von MHC-II eluierte Peptide

Die Betrachtung der Reaktion gegen die elf von MHC-II eluierten Peptide zeigte im Median 10,0 spezifische IFN- γ -produzierende Zellen pro 10^5 PBMZ bei Patienten mit aktiver MS, 3,25 Zellen pro 10^5 PBMZ bei Patienten mit inaktiver MS ($p = 0,021$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur). Die Vergleiche zwischen Patienten mit aktiver MS und Kontrollpersonen ($p = 0,138$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur) und zwischen inaktiver MS und Kontrollpersonen ($p = 1$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur) zeigten keine signifikanten Unterschiede.

4.4.2 Reaktionen gegen von MHC-I eluierte Peptide

Bei Stimulation mit den drei von MHC-I eluierten Peptide wurden im Median 2,13 spezifische IFN- γ -produzierende Zellen pro 10^5 PBMZ bei Patienten mit aktiver MS im Gegensatz zu 0,75 Zellen pro 10^5 PBMZ bei Patienten mit inaktiver MS gefunden ($p = 0,216$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur). Auch hier ergaben sich im jeweiligen Vergleich mit der Kontrollgruppe keine signifikanten Ergebnisse ($p = 1$ für aktive MS versus Kontrollen und $p = 0,741$ für inaktive MS versus Kontrollen, Mann-Whitney-U-Tests, nach Bonferroni-Korrektur).

4.4.3 Reaktionen gegen Kontrollantigene

Gegen das Kontrollantigen Tetanus Toxoid fanden sich in der Kontrollgruppe im Median 1,69 IFN- γ -sezernierende Zellen pro 10^5 PBMZ, in der Gruppe der aktiven MS 1,81 IFN- γ -sezernierende Zellen pro 10^5 PBMZ und in der Gruppe der Patienten mit inaktiver MS 0,75 IFN- γ -sezernierende Zellen pro 10^5 PBMZ ($p = 1$ für alle Vergleiche, Mann-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilten Daten, nach Bonferroni-Korrektur).

Die Frequenzen IFN- γ -sezernierender PBMZ in Reaktion auf Stimulation mit PHA zeigten sich normalverteilt. In der Kontrollgruppe fanden sich im Mittel 229 IFN- γ -sezernierende Zellen pro 10^5 PBMZ, bei den Patienten mit aktiver MS im Mittel 238 IFN- γ -sezernierende Zellen pro 10^5 PBMZ und bei den Patienten mit inaktiver MS im Mittel 231 IFN- γ -sezernierende Zellen pro 10^5 PBMZ ($p = 1$ für alle Vergleiche, T-Test, nach Bonferroni-Korrektur). Die Frequenzen IFN- γ -sezernierender PBMZ gegen die von Tetanus Toxoid, JC-Virus, Chlamydia pneumoniae und MBP abgeleiteten Kontrollpeptide werden im Abschnitt 4.6 genauer dargestellt.

4.5 Spezifische IFN- γ -sezernierende Zellen in verschiedenen Erkrankungsgruppen

Die Zahl der IFN- γ -sezernierenden PBMZ in Reaktion auf alle 14 getesteten eluierten Peptide wurde außerdem neben der Einteilung der MS-Erkrankung in aktive und inaktive Verläufe in die verschiedenen Untergruppen wie das klinisch isolierte Syndrom, die RR-MS, SP-MS und PP-MS aufgeteilt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 als Boxplots dargestellt. Die Stichprobengrößen der einzelnen Untergruppen waren teils sehr klein, im Extremfall beispielsweise nur ein Proband mit inaktiver SP-MS-Erkrankung, so dass von einer weiteren statistischen Auswertung abgesehen wurde. Festzuhalten ist, dass in der Gruppe der SP-MS-Patienten die medianen Zahlen IFN- γ -sezernierender PBMZ mit 12,4 pro 10^5 PBMZ bei den Patienten mit aktiver SP-MS und 15,8 pro 10^5 PBMZ bei dem einzelnen Patienten mit inaktiver SP-MS gegen die getesteten Ligandom-Peptide besonders hoch ausfielen. Dagegen zeigten sich in der Gruppe der Patienten mit inaktiver MS 2,50 pro 10^5 PBMZ für das klinisch isolierte Syndrom, 3,75 pro 10^5 PBMZ für die RR-MS und 6,00 pro 10^5 PBMZ für die PP-MS. Die Gruppe der Patienten mit aktivem klinisch

isoliertem Syndrom wiesen 10,8 pro 10^5 PBMZ auf, die mit aktiver RR-MS 10,5 pro 10^5 PBMZ.

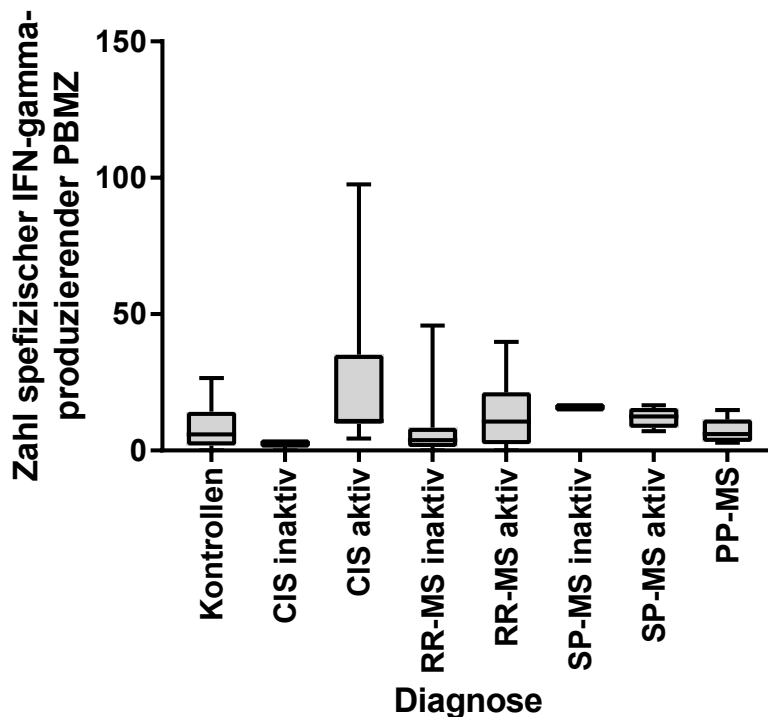


Abbildung 5: Spezifische IFN- γ -produzierende Zellen in verschiedenen MS-Erkrankungsformen und Kontrollpersonen nach Stimulation mit eluierten Peptiden

Dargestellt sind die spezifischen IFN- γ -produzierenden Zellen pro 10^5 PBMZ nach Stimulation mit allen 14 getesteten direkt eluierten Peptiden für die verschiedenen Erkrankungsformen der MS in Form von Boxplots. Die Whisker stellen dabei jeweils den Minimal- und Maximalwert dar. Teils ergaben sich hier sehr kleine Stichprobenzahlen, wie im Extremfall $n = 1$ für die inaktive SP-MS.

4.6 Zahl positiver Peptide in aktiver und inaktiver MS

Weiterhin wurde bestimmt, gegen wie viele der 14 eluierten Peptide in den Gruppen der Patienten mit aktiver oder inaktiver MS-Erkrankung und Kontrollpersonen eine positive Reaktion vorlag. Als positive Peptide wurden diejenigen gewertet, bei denen die mittlere Spotzahl in antigenstimulierten Löchern die mittlere Spotzahl in Kontrolllöchern plus zwei Standardabweichungen überstieg. Für die Zahlen der positiven Peptide lag wiederum keine Normalverteilung vor, für die Gruppe der Patienten mit aktiver MS lag nur im Kolmogorow-Smirnow-Test $p > 0,05$. Es fanden sich in der Kontrollgruppe im Median 1,00 als positiv zu wertendes Peptid, bei Patienten mit inaktiver MS 0,00 positive Peptide, bei Patienten mit aktiver MS dagegen 4,00 positive Peptide. Sowohl der Vergleich der aktiven MS mit Kontrollen ($p = 0,018$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur), als auch der zwischen MS-

Patienten mit inaktiver und aktiver Erkrankung ($p = 0,003$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur) zeigte signifikante Ergebnisse. Die Zahl positiver Peptide unterschied sich zwischen Kontrollgruppe und inaktiven MS-Patienten nicht signifikant ($p = 1$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur). Die jeweiligen Zahlen an positiven Peptiden sind in Abbildung 5 aufgetragen.

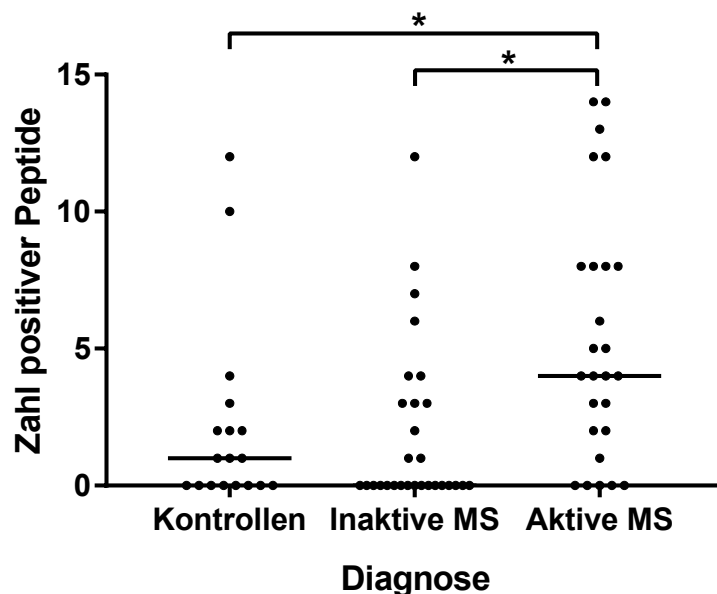


Abbildung 6: Positive Reaktionen gegen eluierte Peptide in aktiver und inaktiver MS und Kontrollpersonen im Vergleich

Die Abbildung zeigt als Dotplot die Zahlen der positiven Reaktionen gegen die 14 getesteten direkt eluierten Peptide mit Medianen in Patienten mit aktiver und inaktiver MS-Erkrankung und Kontrollpersonen. Als positive Reaktion wurde dabei eine mittlere Spitzzahl in einem Patienten gewertet, die die mittlere Spitzzahl in Kontrolllöchern plus zwei Standardabweichungen überstieg. Beim Vergleich der positiven Reaktionen ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit aktiver MS und inaktiver MS einerseits ($p = 0,003$, Mann-Whitney-U-Test) und Kontrollpersonen andererseits ($p = 0,018$, Mann-Whitney-U-Test).

4.6.1 Reaktionen gegen von MHC-II eluierte Peptide

Von den elf von MHC-II eluierten Peptiden zeigten bei Patienten mit aktiver MS im Median 3,50 Peptide eine positive Reaktion, gegenüber 0,00 Peptiden bei Patienten mit inaktiver MS und 0,50 Peptiden bei Kontrollpersonen. Die Unterschiede zwischen aktiver MS mit Kontrollpersonen ($p = 0,021$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur) und inaktiver MS ($p = 0,003$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur) waren im Gegensatz zum Vergleich zwischen Kontrollgruppe und inaktiver MS ($p = 1$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur) signifikant.

4.6.2 Reaktionen gegen von MHC-I eluierte Peptide

Gegen die drei von MHC-I eluierten Peptide fanden sich bei Kontrollpersonen und Patienten mit inaktiver MS im Median 0,00 positive Peptide, bei Patienten mit aktiver MS 1,00 positives Peptid. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und Patienten mit aktiver MS ($p = 0,105$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur) zeigte sich genau wie der Vergleich von Kontrollen mit Patienten mit inaktiver Erkrankung ($p = 1$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur) nicht signifikant, der Vergleich zwischen Patienten mit aktiver und inaktiver Erkrankung erbrachte auch hier ein signifikant unterschiedliches Ergebnis ($p = 0,027$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur).

4.6.3 Reaktionen gegen die Peptide im Einzelnen

Tabelle 3 zeigt, bei wie vielen Personen der einzelnen Gruppen aus Patienten und Kontrollpersonen das jeweilige getestete Peptid eine positive Reaktion hervorrief.

Tabelle 3: Zahl positiver Peptide

Eluierte Peptide	Kontrollen	Inaktive MS	Aktive MS
Aktin	2/18 (11,1%)	2/29 (6,9%)	9/26 (34,6%)
Alpha-synuclein	3/18 (16,7%)	5/29 (17,2%)	10/26 (38,5%)
GFAP ₃₇₅₋₃₈₄	3/18 (16,7%)	4/29 (13,8%)	11/26 (42,3%)
GFAP ₃₈₉₋₄₀₀	4/18 (22,2%)	4/29 (13,8%)	8/26 (30,8%)
Glutamat-Dehydrogenase	3/18 (16,7%)	3/29 (10,3%)	10/26 (38,5%)
Glutamin-Synthetase	2/18 (11,1%)	7/29 (24,1%)	12/26 (46,2%)
MBP ₁₀₋₂₇	2/18 (11,1%)	2/29 (6,9%)	10/26 (38,5%)
MBP ₈₄₋₉₄	2/18 (11,1%)	4/29 (13,8%)	6/26 (23,1%)
MBP ₉₅₋₁₁₀	0/18 (0%)	3/29 (10,3%)	10/26 (38,5%)
MBP ₁₃₉₋₁₅₃	4/18 (22,2%)	3/29 (10,3%)	12/26 (46,2%)
NF-L	3/18 (16,7%)	2/29 (6,9%)	10/26 (38,5%)
NF-3 (von NF-M)	2/18 (11,1%)	4/29 (13,8%)	10/26 (38,5%)
S100	4/18 (22,2%)	6/29 (20,1%)	9/26 (34,6%)
Survivin	4/18 (22,2%)	3/29 (10,3%)	13/26 (50,0%)
MBP ₈₄₋₁₁₂	5/18 (27,8%)	7/29 (24,1%)	10/26 (38,5%)

Kontrollpeptide	Kontrollen	Inaktive MS	Aktive MS
MBP ₈₉₋₁₀₁	2/18 (11,1%)	2/29 (6,9%)	7/26 (26,9%)
MBP ₈₅₋₉₉	4/18 (22,2%)	6/29 (20,1%)	10/26 (38,5%)
Tetanus toxoid (tt830-844)	5/18 (27,8%)	7/29 (24,1%)	8/26 (30,8%)
Chlamydia pneumoniae (Cpn0483)	4/18 (22,2%)	5/29 (17,2%)	11/26 (42,3%)
JC virus (VP1 34-48)	5/18 (27,8%)	6/29 (20,1%)	11/26 (42,3%)

4.7 Frequenzen autoreaktiver PBMZ

Weiterhin wurden die Frequenzen IFN- γ -produzierender PBMZ pro 10^5 PBMZ in Reaktion auf die körpereigenen eluierten und Kontrollpeptide ermittelt. Die Frequenzen zeigten sich gemäß dem Kolmogorow-Smirnow- und Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < 0,05$, Ausnahme: Frequenzen MBP₈₄₋₁₁₂-reaktiver PBMZ bei Normalpersonen im Kolmogorow-Smirnow-Test mit $p > 0,05$). Somit wurden wiederum die medianen Frequenzen IFN- γ -produzierender PBMZ pro 10^5 PBMZ ermittelt, die in Tabelle 4 dargestellt sind. Die maximale mediane Frequenz über alle körpereigenen Peptide lag bei einer IFN- γ -produzierenden Zelle pro 10^5 PBMZ, die Frequenzen gegen die von Tetanus Toxoid, Chlamydia pneumoniae und JC-Virus abgeleiteten Kontrollpeptide lagen in einem vergleichbaren Bereich. Die höchste Frequenz autoreaktiver PBMZ bei einem einzelnen MS-Patienten wurde bei MS31 mit 19,8 IFN- γ -produzierenden Zellen pro 10^5 PBMZ gegen MBP₈₅₋₉₉ detektiert.

Tabelle 4: Frequenzen IFN- γ -produzierender PBMZ pro 10^5 PBMZ

Körpereigenes Peptid	Mediane Frequenz über alle Patienten			Maximale Frequenz in einem Patienten
	Kontrollen	Inaktive MS	Aktive MS	
Aktin	0,00	0,00	0,50	6,75
Alpha-synuclein	0,00	0,25	0,75	6,75
GFAP ₃₇₅₋₃₈₄	0,38	0,00	0,25	5,00
GFAP ₃₈₉₋₄₀₀	0,75	0,00	0,13	3,25
Glutamat-Dehydrogenase	0,00	0,00	0,75	8,00
Glutamin-Synthetase	0,00	0,00	0,50	9,25
MBP ₁₀₋₂₇	0,25	0,00	0,75	7,00
MBP ₈₄₋₉₄	0,00	0,00	0,00	4,50
MBP ₉₅₋₁₁₀	0,25	0,00	1,00	8,25
MBP ₁₃₉₋₁₅₃	0,13	0,00	0,75	11,25
NF-L	0,75	0,00	0,00	12,25
NF-3 (von NF-M)	0,13	0,00	0,50	6,50
S100 Ca-binding protein	0,88	0,25	0,75	8,00
Survivin	0,50	0,25	0,88	8,75
MBP ₈₄₋₁₁₂	0,75	0,00	0,75	9,25
MBP ₈₉₋₁₀₁	0,13	0,00	0,50	6,25
MBP ₈₅₋₉₉	0,25	0,00	0,75	19,75
Körperfremdes Peptid	Kontrollen	Inaktive MS	Aktive MS	
Tetanus toxoid (tt830-844)	0,38	0,00	0,63	57,75
Chlamydia pneumoniae (Cpn0483)	0,25	0,25	0,38	6,25
JC virus (VP1 34-48)	0,50	0,00	1,38	7,50

4.8 HLA-DRB1*1501-Typisierung und Reaktivitäten gegen eluierte Peptide im Vergleich

4.8.1 Typisierung von MS-Patienten und Kontrollpersonen

Patienten und Kontrollpersonen wurden mittels PCR auf das Vorliegen des Risikoallels HLA-DRB1*1501 untersucht. Dabei ergab sich für 21 der 51 untersuchten MS-Patienten ein positives Ergebnis (41,2%). Fünf der 21 MS-Patienten waren homozygot, 16 heterozygot. Von den Blutproben von Patienten mit aktiver MS zeigten sich 46,1%, von den Proben von Patienten mit inaktiver MS 34,5% positiv für HLA-DRB1*1501.

4.8.2 Vergleich Antwort in HLA-DRB1*1501-positiven und -negativen Patienten

Weiterhin wurden die vorherigen Gruppen von Kontrollpersonen, Patienten mit aktiver und inaktiver MS bezüglich ihres Trägerstatus für das Risikoallel HLA-DRB1*1501 für die MS weiter aufgeteilt. Innerhalb der Diagnosegruppen wurden dann die Immunreaktionen auf die von MHC-II eluierten Peptide und auf die direkt von HLA-DRB1*1501 eluierten Peptide erneut verglichen.

Bezüglich der von MHC-II eluierten Peptide fanden sich in den HLA-DRB1*1501-positiven Kontrollpersonen im Median 3,50 IFN- γ -produzierende Zellen pro 10^5 PBMZ gegenüber 4,75 IFN- γ -produzierenden Zellen pro 10^5 PBMZ in HLA-DRB1*1501-negativen Kontrollpersonen. Bei den Patienten mit inaktiver MS waren bei den HLA-DRB1*1501-positiven Patienten im Median 3,63 IFN- γ -produzierende Zellen pro 10^5 PBMZ vorhanden, bei den HLA-DRB1*1501-negativen Patienten dagegen 3,00 IFN- γ -produzierende Zellen pro 10^5 PBMZ. HLA-DRB1*1501-positive Patienten mit aktiver MS zeigten 8,50 IFN- γ -produzierende Zellen pro 10^5 PBMZ gegenüber 10,5 IFN- γ -produzierenden Zellen pro 10^5 PBMZ bei HLA-DRB1*1501-negativen Patienten mit aktiver MS. Alle Vergleiche untereinander waren statistisch nicht signifikant (überall $p = 1$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur).

Bezüglich der von HLA-DRB1*1501 eluierten Peptide zeigten sich vergleichbare Ergebnisse, die in Abbildung 7 dargestellt sind.

HLA-DRB1*1501-positive Kontrollpersonen zeigten im Median 3,13 IFN- γ -produzierende Zellen pro 10^5 PBMZ gegenüber 4,00 IFN- γ -produzierenden Zellen pro 10^5 PBMZ in HLA-DRB1*1501-negativen Kontrollpersonen. Bei den Patienten mit inaktiver MS waren sowohl bei den HLA-DRB1*1501-positiven als auch bei den HLA-DRB1*1501-negativen Patienten im Median 2,50 IFN- γ -produzierende Zellen pro 10^5

PBMZ vorhanden. HLA-DRB1*1501-positive Patienten mit aktiver MS zeigten 7,50 IFN- γ -produzierende Zellen pro 10^5 PBMZ gegenüber 9,13 IFN- γ -produzierende Zellen pro 10^5 PBMZ bei HLA-DRB1*1501-negativen Patienten mit aktiver MS. Auch hier zeigten alle Vergleiche keine statistisch signifikanten Ergebnisse (überall $p = 1$, Mann-Whitney-U-Test, nach Bonferroni-Korrektur).

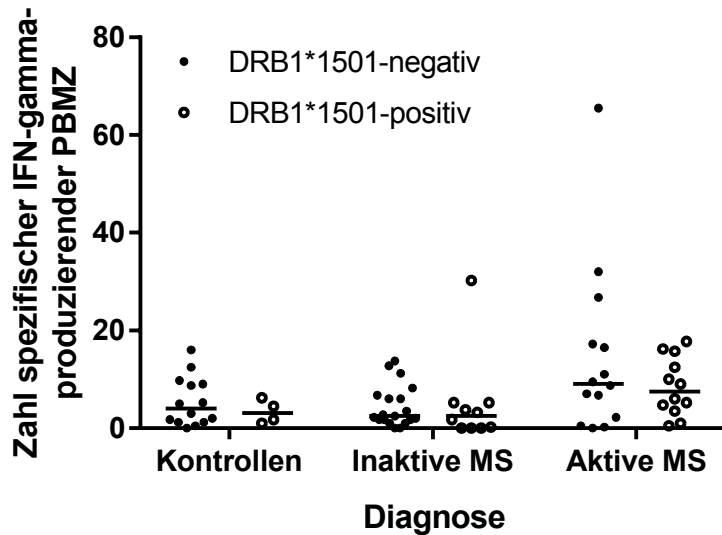


Abbildung 7: Spezifische IFN- γ -produzierende Zellen unter Berücksichtigung des HLA-DRB1*1501-Trägerstatus nach Stimulation mit von HLA-DRB1*1501 eluierten Peptiden

Gezeigt sind wiederum die spezifischen IFN- γ -produzierenden Zellen pro 10^5 PBMZ nach Stimulation mit den elf von HLA-DRB1*1501 eluierten Peptiden. Die Gruppen der Kontrollen, Patienten mit inaktiver und aktiver MS wurden dabei hinsichtlich des Trägerstatus für das Risiko-HLA-Allel HLA-DRB1*1501 weiter unterteilt. Zwischen HLA-DRB1*1501-positiven und negativen Personen zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Tests). Die Abbildung wurde bereits in ähnlicher Form veröffentlicht (Riedhammer et al. 2017).

5. Diskussion

5.1 Methodik

5.1.1 Auswahl der eluierten Peptide

Einige der für diese Studie ausgewählten Peptide, wie beispielsweise die von Aktin oder Glutamin-Synthetase abgeleiteten Peptide, hatten sich auf dem gleichen HLA-Molekül in Autopsieproben verschiedener Spender und zusätzlich auch auf anderen HLA-Molekülen gefunden. Auch die meisten der getesteten anderen Peptide waren, wenn nicht in gleicher, so doch in ähnlicher Sequenz in mehr als einem Gehirnsponder vorgekommen (vergleiche Tabelle 1). Ein weiterer wichtiger Faktor für die Auswahl der Peptide stellte eine bereits zuvor gezeigte mögliche Rolle des Antigens in der Erkrankung der MS dar, so dass verschiedene von MBP abgeleitete Peptide ausgewählt wurden. Die Testung von Peptiden der Glutamin-Synthetase und Glutamat-Dehydrogenase erschien aufgrund der in der MS diskutierten Rolle einer Glutamat-Exzitotoxizität interessant, GFAP, S100 β -Protein und Neurofilament faszinierten als gliale bzw. neuronale Antigene, bei denen eine Bedeutung als Biomarker in der Erkrankung diskutiert wird, α -Synuclein und Survivin als bei neuronaler Degeneration und Apoptose beteiligte Proteine. Zusammenfassend waren die Peptide so ausgewählt worden, dass eine mögliche Rolle als Autoantigene in einer möglichst großen Gruppe von MS-Patienten denkbar erschien.

5.1.2 Nachweis von IFN- γ -sezernierenden Zellen mittels ELISpot

Um eine IFN- γ -Produktion durch potenziell autoreaktive Zellen nachzuweisen, wurden angesichts der Ergebnisse in Bezug auf die geringere Sensitivität des ELISA beim Nachweis von IFN- γ im Vergleich zum ELISpot keine absoluten IFN- γ -Spiegel in den Zellüberständen der durchgeführten ELISpot-Versuche bestimmt. Die hier getroffene Beobachtung der geringeren Sensitivität des ELISA stimmt mit Studien anderer Gruppen überein: Beispielsweise konnte vor einer Impfung mit Tetanus-Toxoid ein IFN- γ -ELISpot T-Gedächtniszellen mit einer höheren Sensitivität nachweisen als der entsprechende IFN- γ -ELISA (Tassignon et al. 2005). Auch eine IFN- γ -Sekretion in Antwort auf von CMV abgeleitete Peptide (Tischer et al. 2014) oder nach Stimulation von PBMZ mit PPD (Doherty et al. 2005), sowie eine IFN- γ -Sekretion durch natürliche Killerzellen (Lion et al. 2009) ließen sich im ELISpot mit einer höheren Sensitivität als im ELISA detektieren. ELISpot-Versuche erwiesen sich im Vergleich zum ELISA auch

beim Nachweis anderer Zytokine wie IL-21 (Huang et al. 2015) oder einer Perforin-Freisetzung (Zuber et al. 2005) als sensitiver.

Als Erklärung für die Sensitivitätsunterschiede könnte die Tatsache dienen, dass im ELISpot-Versuch das sezernierte Zytokin sofort gebunden wird, während im ELISA nachweisbares Zytokin durch Bindung an zelluläre Rezeptoren verloren gehen könnte (Huang et al. 2015, Tassignon et al. 2005).

5.1.3 Testung der ganzen PBMZ-Fraktion

Im Unterschied zu vielen anderen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit die ganze PBMZ-Fraktion in ELISpot-Versuchen eingesetzt, anstelle zuerst CD4⁺-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen zu isolieren oder Peptid-spezifische T-Zell-Linien zu testen. Diese Methode wurde bewusst gewählt, um die Zusammensetzung der Leukozyten möglichst natürlich zu erhalten und das von ihnen etablierte Zytokinmilieu unverfälschter abzubilden. Diese Strategie war zuvor auch von anderen Gruppen angewandt worden (Dang et al. 2011). Der Nachteil der Methode ist, dass die IFN- γ -sezernierenden Zellen somit nicht eindeutig einem Zelltyp zugeordnet werden können. Außer durch Th1-Zellen ist eine IFN- γ -Produktion auch beispielsweise durch CD8⁺-Zellen (Becher et al. 1999) oder IFN- γ -sezernierende Th17-Zellen möglich (Paroni et al. 2017).

5.2 Elution als Möglichkeit zur Autoantigensuche

Der Ansatz, Peptide von MHC-Molekülen zu eluieren, wurde auch in anderen Studien genutzt, beispielsweise um im Rahmen der Induktion zentraler Toleranz präsentierte Peptide im Thymus zu identifizieren (Adamopoulou et al. 2013) oder von dendritischen Zellen der Milz präsentierte Peptide zu entschlüsseln (Bozzacco et al. 2011). Auch in Studien über andere Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder dem Diabetes mellitus Typ 1 wurde die Methode angewandt (Kirschmann et al. 1995, Peakman et al. 1999).

Grundsätzlich ist die Elution von Peptiden von APZ reizvoll aufgrund einer direkten Abbildungsmöglichkeit der erfolgten Antigenpräsentation und damit unter anderem auch der potenziellen Identifikation von Autoantigenen in Autoimmunerkrankungen.

In einigen Studien, die Peptide von bestimmten MHC-Molekülen eluierten, wurden jedoch als Ausgangsmaterial EBV-transformierte Zelllinien verwendet (Kirschmann et al. 1995, Peakman et al. 1999, Nakanishi et al. 2005, Vogt et al. 1994). In anderen

Untersuchungen, zum Teil auch mit anderer Fragestellung, erfolgte eine vorherige Antigenexposition der Antigen-präsentierenden Zellen (Mohme et al. 2013, Nepom et al. 2001, Peakman et al. 1999).

Der besondere Vorteil der Studie von Fissolo et al. (Fissolo et al. 2009) ist die Verwendung von ZNS-Autopsiematerial und damit nativem Material aus dem Zielorgan der MS zur Elution der Peptide. Dieser Aspekt macht die gefundenen Peptide bezüglich einer Rolle in der MS besonders interessant.

5.3 IFN- γ zur Charakterisierung autoreaktiver Zellen in der MS

Wie eingangs genauer dargestellt, wird IFN- γ -sezernierenden Th1-Zellen eine wichtige Rolle in der MS zugeschrieben (Olsson 1992). Die mögliche pathogene Relevanz dieses Zytokins wird noch dadurch unterstrichen, dass die Verabreichung von IFN- γ an MS-Patienten bei einer Studie zu einem signifikanten Anstieg von Schüben führte (Panitch et al. 1987). Besonders interessant ist auch, dass neben Th1-Zellen auch Th1-Th17-Zellen IFN- γ produzieren, die mittlerweile in der MS als besonders pathogen diskutiert werden (Paroni et al. 2017). Aus diesen Gründen wurde entschieden, PBMZ auf die Sekretion dieses Zytokins zu untersuchen. Andererseits existieren auch regulatorische CD8⁺-Zellpopulationen, die durch IFN- γ induziert werden (Cunnusamy et al. 2014). Für künftige Analysen und als Ergänzung der vorliegenden Daten wäre somit neben IFN- γ aufgrund der beschriebenen Rolle von Th17-Zellen und gerade auch der Th1-Th17-Zellen auch die Untersuchung von PBMZ auf eine IL-17-Sekretion interessant.

5.4 Frequenzen autoreaktiver Zellen im Vergleich mit der Literatur

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen medianen Frequenzen autoreaktiver und gegen Kontrollpeptide reagierender PBMZ beliefen sich auf zwischen null und einer Zelle pro 10⁵ PBMZ, die maximalen beobachteten Frequenzen 19,75 Zellen pro 10⁵ PBMZ (hier gegen MBP₈₅₋₉₉) im Vergleich zu maximalen 57,75 Zellen pro 10⁵ PBMZ in Reaktion auf ein Tetanus-Toxoid-Peptid.

Die in der Literatur beschriebenen Frequenzen sind methodenabhängig.

Nur wenige Studien untersuchten die Frequenz MBP-reaktiver PBMZ mittels IFN- γ -ELISpot-Assays: Studien, die die Reaktion auf das ganze MBP-Molekül testeten, fanden 1,5 (Söderström et al. 1993), 2,7 (Olsson et al. 1990) bzw. 4,1 (Hellings et al. 2001) MBP-reaktive Zellen pro 10⁵ PBMZ. Bei der Testung einzelner MBP-Peptide

wurden zwischen 10,4 und 22,5 IFN- γ -sezernierende Zellen pro 10^5 PBMZ detektiert (Olsson et al. 1992). Andere Studien zeigten niedrigere Zahlen gegen MBP₈₀₋₁₀₂ mit etwa zwei IFN- γ -sezernierenden Zellen pro 10^5 PBMZ (Wallström et al. 1998) bzw. weniger als einer reaktive PBMZ für die beiden Peptide MBP₈₄₋₁₀₂ und MBP₁₄₃₋₁₆₈ zusammen (Hellings et al. 2001).

Die mittels ELISpot detektierten Frequenzen autoreaktiver Zellen gegenüber MOG, einem anderen möglichen Autoantigen, bewegten sich zum Vergleich ebenfalls in einem Bereich von 22,1 IFN- γ -sezernierenden Zellen pro 10^5 PBMZ bei MS-Patienten und 7,6 IFN- γ -sezernierenden Zellen pro 10^5 PBMZ bei Kontrollpersonen (Sun et al. 1991), für einzelne MOG-Peptide fanden sich Frequenzen zwischen etwa einer und vier IFN- γ -sezernierenden Zellen pro 10^5 PBMZ (Wallström et al. 1998).

Andere Studien basierend auf Proliferationsbestimmung und Verdünnungsanalysen (*limiting dilution analysis*) fanden zum Teil niedrigere Frequenzen MBP-spezifischer T-Zellen. Die gefundenen Frequenzen bewegten sich von 0,067 pro 10^5 Zellen (Jingwu et al. 1992) über 0,11 pro 10^5 Zellen (Zhang et al. 1994) bis hin zu 0,61 pro 10^5 Zellen (Chou et al. 1992). In einer eingangs bereits erwähnten klinischen Studie mit einem veränderten Peptidliganden (*altered peptide ligand*) bezogen auf MBP₈₃₋₉₉ fand sich eine Korrelation der T-Zell-Frequenzen mit der Krankheitsaktivität. In einem Patienten, der unter dem veränderten Peptidliganden einen Schub entwickelte, stieg die Frequenz MBP₈₃₋₉₉-spezifischer T-Zellen pro 10^5 PBMZ von 0,03 vor Therapiebeginn auf 119,05 während des Schubs unter dem Peptidliganden an (Bielekova et al. 2000). Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Frequenzen IFN- γ -sezernierender PBMZ sind somit mit denen anderer Studien vergleichbar. Zwar fanden sich etwas niedrigere Zahlen MBP-spezifischer IFN- γ -positiver Zellen im ELISpot als in einem Teil der oben angeführten ELISpot-nutzenden Studien, die teils aber auch das ganze MBP-Molekül getestet hatten. Die hier gefundenen Frequenzen dagegen lagen andererseits höher als die mit anderen Methoden bestimmten in anderen Studien. Außerdem gilt es zu bedenken, dass noch weitere autoreaktive PBMZ, die andere Zytokine als IFN- γ sezernieren, hier nicht bedacht sind.

5.5 Höhere Frequenzen IFN- γ -sezernierender PBMZ gegenüber eluierten Peptiden in aktiver MS

In der vorliegenden Arbeit wurden signifikant höhere Frequenzen IFN- γ -sezernierender PBMZ in aktiver MS verglichen mit inaktiver MS und eine höhere Zahl

an eine positive Reaktion induzierenden eluierten Peptiden in aktiver MS verglichen mit inaktiver MS und Kontrollpersonen gefunden.

5.5.1 Mögliche Gründe für erhöhte Reaktivität in aktiver MS

Für dieses Ergebnis bieten sich mehrere Erklärungen: Die höhere Reaktivität in Patienten mit aktiver MS könnte das Ergebnis einer generellen Hyperreaktivität des Immunsystems sein. Die geringere Reaktivität in inaktiver MS könnte mit einem erhöhten Anteil immunmodulatorischer Therapien in dieser Gruppe zusammenhängen. Andererseits können die Daten auch einen Hinweis auf eine mögliche Rolle der getesteten Peptide als Autoantigene bieten.

Gegen eine generelle Hyperreaktivität des Immunsystems in Patienten mit aktiver MS spricht, dass sich in Reaktion auf Tetanus Toxoid und auf Stimulation mit PHA keine unterschiedlichen Reaktionen ergaben. Auch in Reaktion auf das von Tetanus Toxoid abgeleitete getestete Peptid zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der IFN- γ -produzierenden PBMZ insbesondere zwischen aktiver und inaktiver Erkrankung ($p = 0.28$). Bei Betrachtung der Zahl der positiven Peptide fiel allerdings auf, dass die von JC-Virus und Chlamydia pneumoniae abgeleiteten Peptide in etwas mehr Patienten mit aktiver MS eine positive Reaktion hervorriefen. Da viele Personen JC-Virussträger ohne Zeichen einer aktiven ZNS-Infektion sind, erscheint die Intensivierung einer Immunantwort im Rahmen einer aktiven ZNS-Entzündung denkbar. Erhöhte CD8⁺-Zellantworten wurden in MS-Patienten gefunden (Du Pasquier et al. 2006). Bezüglich der Rolle von Chlamydia pneumoniae ist die Datenlage widersprüchlich (Bagos et al. 2003, Buljevac et al. 2003, Sriram et al. 2005). Eine Metaanalyse konnte erhöhte Level von Chlamydia pneumoniae-DNA im Liquor von MS-Patienten zeigen, ein ätiologischer Zusammenhang bleibt jedoch fraglich (Bagos et al. 2003).

Ein anderer Aspekt bei der Betrachtung erhöhter IFN- γ -positiver Zellen in aktiver MS ist, dass in der für diese Untersuchung vorliegenden Patientengruppe ein höherer Anteil der Patienten mit inaktiver MS mit immunmodulatorischen Substanzen behandelt war als in der Patientengruppe mit aktiver MS, was auch dem Umstand mitgeschuldet ist, dass in der Gruppe der Patienten mit aktiver MS einige Patienten mit der Erstmanifestation der Erkrankung untersucht wurden. In einer Studie ergaben sich in der durchflusszytometrischen Analyse Hinweise auf geringere Zahlen IFN- γ -positiver Zellen bei mit Interferon- β -behandelten MS-Patienten, wobei aber auch schon eine allgemein geringere Zahl IFN- γ -positiver Zellen bei MS-Patienten im

Vergleich zu Kontrollpersonen aufgefallen war (Becher et al. 1999). In einer anderen Studie zeigte sich eine geringere IFN- γ -Produktion in Concanavalin A-stimulierten PBMZ unter IFN- β -Therapie (Noronha et al. 1993). Beide Effekte zeigten sich in der vorliegenden Arbeit nicht. Stattdessen war die Zahl der ohne Antigenstimulation IFN- γ -sezernierenden PBMZ bei Patienten mit inaktiver MS sogar höher als in der Gruppe der Patienten mit aktiver Erkrankung. Die Ergebnisse nach PHA-Stimulation zeigten keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich somit mit einer anderen Studie, in der kein Abfall IFN- γ -produzierender Th1-Zellen unter IFN- β auffiel (Durelli et al. 2009).

5.5.2 Peptide als primäre Autoantigene oder Rolle in Epitope Spreading?

Somit gibt die vorliegende Arbeit einen Hinweis darauf, dass die getesteten eluierten natürlich im ZNS von MS-Patienten präsentierten Peptide eine Rolle als mögliche Autoantigene in der MS spielen könnten. Unter der Annahme stellt sich die Frage, ob die Peptide als primäre Autoantigene fungieren könnten, oder ob sich die Immunantwort erst im Verlauf des Epitope Spreading auf diese Peptide ausweitet. Dabei ist zu bedenken, dass die Autopsiespender entweder von vornherein an der Verlaufsform PP-MS, bei der verstärkt eine neurodegenerative Komponente diskutiert wird (Matthews 2004, Miller 2007), oder SP-MS litten, in die eine schubförmige Verlaufsform nach meist erst vielen Jahren übergeht. Somit wäre auch eine Ausweitung der Autoimmunantwort gegen diese natürlich präsentierten Peptide im Laufe des Epitope Spreading denkbar. Dafür sprechen auch die hier beobachteten besonders hohen Reaktivitäten bei SP-MS-Patienten.

Einige der Antigene, von denen die getesteten eluierten Peptide abgeleitet sind, wurden bisher eher als Biomarker und weniger als Autoantigene diskutiert. Diese Antigene, die bei neuronalem Zellschaden frei werden und als Biomarker gehandelt werden, könnten aber auch durchaus durch autoimmune Prozesse im Verlauf der Erkrankung angegriffen werden. Auch eine mögliche Rolle der eluierten Peptide im Rahmen des Epitope Spreading schmälert somit die mögliche Bedeutung der Peptide nicht, da für das Verständnis der Pathogenese der Erkrankung sowie eine auf sehr lange Sicht mögliche Therapieentwicklung auch hinzukommende Autoantigene bedacht werden müssen. Auch Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom zeigten in der vorliegenden Antwort bereits positive Reaktionen auf mehrere der eluierten

Peptide. Der Prozess des Epitope Spreading wurde auch schon in pädiatrischen MS-Patienten beobachtet (Quintana et al. 2014).

5.5.3 Einfluss von HLA-DRB1*1501

Wie oben beschrieben wurde, stellt ein Trägerstatus von HLA-DRB1*1501 das größte genetisch übertragbare Risiko für die MS dar und kommt in etwa einem Drittel der MS-Patienten vor (Zhang et al. 2011). Um dem Rechnung zu tragen, waren für die in der vorliegenden Arbeit getesteten 15 eluierten Peptiden elf ausgewählt worden, die von HLA-DRB1*1501 eluiert worden waren. Interessanterweise zeigten sich in Reaktion auf die getesteten Peptide keine unterschiedlichen Frequenzen IFN- γ -sezernierender Zellen in HLA-DRB1*1501-positiven und -negativen Patienten. Von HLA-DRB1*1501 eluierte Peptide riefen in HLA-DRB1*1501-negativen Personen positive Reaktionen hervor, aber auch nicht von HLA-DRB1*1501-eluierte Peptide zeigten auch in HLA-DRB1*1501-positiven Personen positive Reaktionen.

Die fehlenden Unterschiede der von HLA-DRB1*1501 eluierten Peptide in Allelträgern und -nichtträgern lassen sich dadurch erklären, dass wie oben beschrieben die Peptide zum Teil neben HLA-DRB1*1501 auch noch von anderen HLA-Molekülen eluiert wurden und somit wahrscheinlich von verschiedenen HLA-Molekülen präsentiert werden können. Für verschiedene MBP-Peptide (beispielsweise MBP₁₃₋₃₂, MBP₈₄₋₁₀₃/MBP₈₀₋₁₀₄, MBP₁₄₄₋₁₆₃/MBP₁₃₉₋₁₅₃) wurde auch in anderen Studien bereits gezeigt, dass sie auf unterschiedlichen HLA-Molekülen präsentiert werden können (Meinl et al. 1993, Valli et al. 1993). Für das auch hier getestete Peptid MBP₁₃₉₋₁₅₃, das von Fissolo et al. (Fissolo et al. 2009) von HLA-DRB1*1501 eluiert worden war, war beispielsweise in einer anderen Studie auch eine HLA-Restriktion durch HLA-DRB1*0501 und HLA-DRB1*0101 gezeigt worden (Meinl et al. 1993), für MBP₁₆₋₃₈ wurde eine HLA-Restriktion durch HLA-DRB5*0101 und HLA-DRB1*1501 beschrieben (Salvetti et al. 1993). Eine vollständige HLA-Typisierung der Studienteilnehmer war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, weshalb keine definitive Aussage darüber getroffen werden kann, ob manche Peptide zusätzlich von HLA-Molekülen präsentiert werden konnten, von denen sie nicht eluiert worden waren. Die Daten deuten aber auf eine so genannte „degenerative“ Bindungsfähigkeit einiger Peptide hin.

5.5.4 Unterschiede zwischen von MHC-I und MHC-II eluierten Peptiden

Generell ist anzunehmen, dass die zu den PBMZ gegebenen Peptide ohne intrazelluläre Prozessierung an freie MHC-Moleküle auf den Zelloberflächen binden können. Die Existenz solcher freier MHC-Moleküle, an die kein Peptid gebunden ist, wurde nachgewiesen und wird durch die Bindung des Peptids stabilisiert (Santambrogio et al. 1999, Schumacher et al. 1990)

Drei der getesteten Peptide waren von MHC-I-Molekülen eluiert worden. Auch nach Stimulation mit diesen Peptiden zeigten sich spezifische IFN- γ -produzierende Zellen. Diese könnten autoreaktive IFN- γ -sezernierende CD8⁺-Zellen darstellen, wie sie in anderen Studien nachgewiesen wurden (Crawford et al. 2004, Zang et al. 2004).

Sie könnten aber möglicherweise auch Th1-Zellen entsprechen, die mit MHC-II-Molekülen interagieren: Die drei von MHC-I eluierten Peptide wiesen eine Länge von zehn (GFAP₃₇₅₋₃₈₄ und S100- β), und 13 Aminosäuren (NF-L) auf. Besonders bei dem von NF-L abgeleiteten Peptid mit 13 Aminosäuren ist denkbar, dass eine Bindung an MHC-II-Moleküle und damit Interaktion mit CD4⁺-Zellen stattfinden könnte. Zwar binden an MHC-II-Moleküle vorwiegend Peptide mit einer Länge zwischen 15 und 18 Aminosäuren, es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass kürzere Peptide von MHC-II präsentiert werden können (Chicz et al. 1993). Allerdings ist für eine erfolgreiche Bindung eines Peptids an ein MHC-Molekül nicht nur die Länge wichtig, sondern auch das Vorhandensein verschiedener Motive im Peptid, die zu den spezifischen Taschen des jeweiligen MHC-Moleküls passen (Rammensee 1995). Einige der hier getesteten mit MHC-II assoziierten Peptide wiesen auch nur eine Länge von neun Aminosäuren (Survivin), elf Aminosäuren (Glutamat-Dehydrogenase, Alpha-Synuclein, MBP₈₄₋₉₄, NF-3), zwölf (GFAP₃₈₉₋₄₀₀) oder 13 Aminosäuren (Glutamin-Synthetase) auf. Außerdem könnte auch eine endozytotische Aufnahme von extrazellulären Peptiden vermutet werden und dann eine Präsentation auf MHC-II-Molekülen erfolgen. Unter Umständen wäre umgekehrt sogar eine Kreuzpräsentation auf MHC-I-Molekülen nach Endozytose eines Peptids denkbar.

Trotz der Beobachtung spezifischer Zellantworten auf die von MHC-I eluierten Peptide zeigten sich für die Summen der IFN- γ -sezernierenden PBMZ im Gegensatz zu den von MHC-II eluierten Peptiden keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit aktiver und inaktiver MS-Erkrankung. Signifikante Unterschiede ergaben sich allerdings beim Vergleich der Zahl als positiv gewerteter Peptide zwischen aktiver und inaktiver MS. Dabei ist aber zu bedenken, dass hier nur die Reaktivitäten gegen drei

Peptide addiert wurden, während in die Statistik für die von MHC-II eluierten Peptide elf Peptide eingingen. Möglicherweise wären vergleichbare feine Unterschiede in der Zahl spezifisch IFN- γ -sezernierender PBMZ zwischen aktiver und inaktiver Erkrankung bei einem größeren von MHC-I abgeleiteten Peptidpool detektierbar gewesen.

In der vorliegenden Arbeit konnten keine genaueren Analysen bezüglich der CD4⁺- und CD8⁺-Zellantwort durchgeführt werden. Für eine erweiterte Betrachtung der Thematik wäre zusätzlich die Durchführung von ELISpot-Versuchen mit vorangehender Zellseparation der PBMZ beispielsweise mittels magnetischer Auftrennung und Applikation von CD4⁺-Zellen und APZ interessant, um die betrachtete IFN- γ -Sekretion sicher CD4⁺-Zellen zuordnen zu können. Auch eine weitere Analyse spezifischer Reaktionen auf von MHC-I eluierten natürlich im ZNS von MS-Patienten präsentierten Peptiden wäre besonders reizvoll, da nur spezialisierte Immunzellen MHC-II exprimieren und MHC-I-Moleküle auch von den Zielzellen der Autoimmunantwort in der MS wie Oligodendrozyten exprimiert werden. Zur genaueren Evaluierung einer zytotoxischen CD8⁺-Zellantwort wäre beispielsweise eine Messung der Granzym-Spiegel aussagekräftig

5.6 Die getesteten Peptide als mögliche Autoantigene im Einzelnen

5.6.1 MBP

MBP wird, wie oben beschrieben, schon lange als mögliches Autoantigen in der MS diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene MBP-Peptide getestet. Zur besseren Übersicht zeigt Abbildung 8 die Positionen der getesteten eluierten Peptide und Vergleichspeptide innerhalb des Proteins.

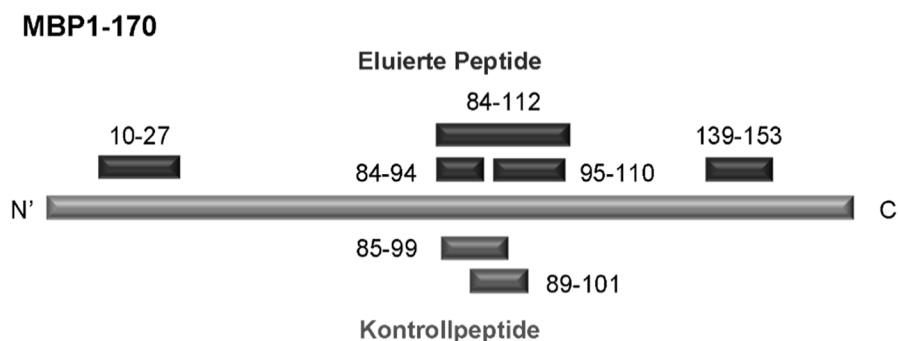


Abbildung 8: Übersicht über die getesteten MBP-Peptide

Hier zeigten sich die größten Unterschiede an als positiv gewerteten Peptiden zwischen aktiver MS einerseits und inaktiver MS und Kontrollpersonen andererseits für die Peptide MBP₁₀₋₂₇ und MBP₁₃₉₋₁₅₃. Bei den medianen Frequenzen IFN- γ -sezernierender PBMZ erwies sich auch MBP₉₅₋₁₁₀ als weiteres unterscheidendes Peptid. Die Unterschiede für die Peptide MBP₈₄₋₉₄ und MBP₈₄₋₁₁₂, und die Kontrollpeptide MBP₈₅₋₉₉ und MBP₈₉₋₁₀₁ waren weniger ausgeprägt. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit einer Studie, in der durch Anwendung niedrig dosierter MBP-Peptide in der Konzentration von 1 μ M das Vorhandensein hoch avider T-Zellen untersucht wurde (Bielekova et al. 2004). Umgerechnet entspricht die Konzentration von 1 μ M für die von Bielekova et al. getesteten MBP-Peptide einer Konzentration zwischen 2.0 μ g/ml und 2.7 μ g/ml, die sich damit in einem ähnlichen Bereich wie die in der hier vorliegenden Untersuchung angewandte Peptidkonzentration von 3 μ g/ml bewegt. Interessanterweise zeigten sich die deutlichsten Unterschiede der Immunreaktivitäten in der Studie von Bielekova et al. für die Peptide MBP₁₃₋₃₂, MBP₁₁₁₋₁₂₉ und MBP₁₄₆₋₁₇₀. Das Epitop MBP₈₃₋₉₉ hingegen zeigte sich in dieser Studie (Bielekova et al. 2004) im Gegensatz zu anderen Studien (Martin et al. 1991, Valli et al. 1992, Meinl et al. 1993, Salvetti et al. 1993) nicht immundominant. Dennoch ist diese Epitop-Region von MBP auch in anderen Studien bedeutsam. Das auch hier als Kontrollpeptid getestete MBP₈₅₋₉₉ ließ sich in MS-Läsionen im ZNS nachweisen (Krogsgaard et al. 2000). Auch vermehrte Antworten von IFN- γ -sezernierenden CD8⁺-Zellen auf das MBP-Peptid MBP₈₇₋₉₅ wurden in MS-Patienten beschrieben (Zang et al. 2004). Reaktionen gegen MBP₁₃₁₋₁₄₉ zeigten sich in Patienten mit länger dauernder Erkrankung häufiger als in solchen mit erst seit kurzem bestehender Erkrankung (Davies et al. 2005). Zusammenfassend stellt MBP ein wichtiges mögliches Autoantigen in der Erkrankung dar, bei dem neben dem schon lange diskutierten Epitop MBP₈₃₋₉₉ auch andere Epitope eine Rolle spielen, wie auch die hier diskutierten Ergebnisse bestätigen.

5.6.2 Survivin

Das Peptid, bei dem sich die als positiv gewertete IFN- γ -Sekretion zwischen Patienten mit aktiver und inaktiver MS am meisten unterschied, war von Survivin abgeleitet. In jedem zweiten Patienten mit aktiver MS zeigten sich positive Reaktionen gegen das getestete Survivin-Peptid, demgegenüber fielen die Reaktionen in Kontrollen und Patienten mit inaktiver MS nur halb bzw. ein Viertel so hoch aus.

Bisher ist für Survivin nur eine erhöhte Expression in aktivierten Lymphozyten von MS-Patienten gezeigt, aber keine Rolle als mögliches Autoantigen diskutiert worden. Autoimmunantworten gegen Survivin wurden bisher bei Tumorpatienten (Rohayem et al. 2000), aber nicht in Autoimmunerkrankungen beschrieben. Ein autoimmuner Angriff auf Survivin könnte die Apoptose von Survivin-exprimierenden Zellen begünstigen. Survivin wird während der Embryonalentwicklung unter anderem auch von Neuronen exprimiert und spielt eine große Rolle in der Gehirnentwicklung durch die Verhinderung neuronaler Apoptose (Jiang et al. 2005). Die Expression in terminal differenzierten Geweben ist jedoch normalerweise niedrig (Fukuda und Pelus 2006). Eine Hochregulation der Survivin-Expression im Gehirn wurde aber beispielsweise in vaskulären Endothelzellen von Infarktgewebe beobachtet (Conway et al. 2003). Ob eine Survivin-spezifische Autoimmunreaktion somit eine neuronale Apoptose in der MS begünstigen könnte, ist momentan schwierig zu beantworten.

5.6.3 Saures Gliafaserprotein (GFAP), Neurofilament, und S100

Den Proteinen GFAP, Neurofilament, und S100 ist gemeinsam, dass alle drei als mögliche Biomarker in der MS diskutiert werden. Als Autoantigene wurden sie bisher nur teilweise in Betracht gezogen. GFAP- und S100- β -reaktive Zellen rufen im Tiermodell eine MS-ähnliche Erkrankung hervor (Kojima et al. 1994, Sasaki et al. 2014). Für Neurofilament und S100- β gibt es auch Daten für die MS-Erkrankung des Menschen in Form von Autoantikörpern gegen NF (Bartos et al. 2007) und dem Nachweis S100- β -spezifischer T-Zellen in MS-Patienten und Kontrollen, die auch IFN- γ sezernieren können (Schmidt et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei von GFAP abgeleitete Peptide getestet, das von MHC-I eluierte GFAP₃₇₅₋₃₈₄ und das von MHC-II eluierte GFAP₃₈₉₋₄₀₀, weiterhin zwei von Neurofilament abgeleitete Peptide, davon eines von der leichten Kette und von MHC-I eluiert, das andere von der mittelschweren Kette und von MHC-II eluiert, sowie ein von MHC-I eluiertes Peptid von S100. Für diese Peptide fiel der Anteil positiver Reaktionen auf die jeweiligen Peptide in der Gruppe der Patienten mit aktiver MS um bis zu 30% höher aus als in der Gruppe der Patienten mit inaktiver MS, wobei die Unterschiede dennoch teils geringer waren als für andere Peptide. Bei den medianen Frequenzen IFN- γ -sezernierender PBMZ lagen teils sogar die Werte sogar der Kontrollpersonen höher als die der MS-Patienten. In dieser Gruppe von Peptiden befanden sich auch alle drei hier getesteten von MHC-I eluierten Peptide. Bei der

Betrachtung der einzelnen Peptide zeigten sich jedoch keine unterschiedlich hohen Antworten zwischen von MHC-I und MHC-II eluierten Peptiden.

Besonders für diese Antigene, die als Biomarker diskutiert werden, ist es denkbar, dass diese bei neuronaler Zellschädigung freigelegt werden und in der Folge eine Autoimmunantwort gegen diese so genannten Neo-Antigene ausgelöst wird, die die Schädigung noch weiter verstärkt.

5.6.4 Aktin

Das von Aktin abgeleitete in dieser Arbeit getestete Peptid stellte sich besonders interessant dar, da es in der getesteten Sequenz in fünf der acht Autopsiespendern der Fissolo et al. (Fissolo et al. 2009) zur Verfügung stehenden Gewebeproben vorkam und zusätzlich in weiteren zwei von acht Autopsieproben in ähnlicher Sequenz. Eine mögliche Rolle von Aktin ist in der MS allerdings bisher weitgehend unbekannt. In einer Studie wurden erhöhte Aktinspiegel im Liquor korrelierend mit dem Grad der Behinderung gefunden (Semra et al. 2002). Hier zeigten sich sowohl bei der Zahl der positiven Reaktionen als auch bei der Frequenzen IFN- γ -sezernierender PBMZ höhere Werte in Patienten mit aktiver MS als inaktiver MS und Kontrollpersonen. Auch für Aktin ist eine Exposition als Neoantigen im Rahmen von Zellschädigung und nachfolgende Autoimmunantwort denkbar.

5.6.5 Alpha-Synuclein

Sowohl bei den Frequenzen IFN- γ -produzierender Zellen und den als positiv zu wertenden Reaktionen zeigten sich nach Stimulation mit dem von alpha-Synuclein abgeleiteten Peptid mäßig höhere Zahlen in Patienten mit aktiver MS gegenüber Kontrollpersonen und Patienten mit inaktiver MS. Eine Rolle als Autoantigen in der MS wäre vergleichbar mit den kürzlichen Beobachtungen im Tiermodell vorstellbar, das Fehlen von alpha-Synuclein eine erhöhte Th1-Zellantwort und einen früheren Symptombeginn begünstigte (Ettle et al. 2016). Die aktuellen Daten im Menschen sind jedoch noch zu kontrovers, um eine solche Aussage treffen zu können.

5.6.6 Glutamin-Synthetase und Glutamat-Dehydrogenase

Glutamat wird, wie eingangs erwähnt, eine exzitotoxische Rolle in der MS zugeschrieben. Die beiden Enzyme Glutamin-Synthetase und Glutamat-Dehydrogenase, von denen jeweils ein abgeleitetes Peptid getestet wurde, sind beide am Abbau von Glutamat beteiligt. Ihre Aktivität zeigte sich in aktiven MS-Läsionen

vermindert (Werner et al. 2001). Solche eine Verminderung der Enzymaktivität ist auch bei einer autoimmunen Reaktion gegen die beiden Enzyme vorstellbar, einhergehend mit nachfolgendem Glutamat-Anstieg. Gegen beide getestete Peptide ergaben sich auch vergleichsweise große Unterschiede in den Frequenzen IFN- γ produzierender PBMZ und in der Zahl der positiven Reaktionen gegenüber den Peptiden in Patienten mit aktiver MS gegenüber inaktiver MS sowie Kontrollpersonen. Die Enzyme stellen also ein möglicherweise interessantes Ziel einer Autoimmunantwort in der MS dar.

5.7 Antigen-spezifische Therapieformen und Ausblick

Auf lange Sicht ließe sich die Identifizierung von Zielantigenen der Erkrankung zur Entwicklung Antigen-spezifischer Therapieformen nutzen. Bisher wurden bereits verschiedene Verfahren in Bezug auf potenzielle Autoantigene getestet.

5.7.1 DNA-Vakzinierungen

Eine bereits versuchte Methode stellt die DNA-Vakzinierung dar, die beispielsweise mit einer für MBP kodierenden Vakzine durchgeführt wurde (Bar-Or et al. 2007, Garren et al. 2008). Der erhoffte Wirkmechanismus ist eine MBP-Produktion durch APZ und nachfolgende Toleranzinduktion in T-Zellen. Zwar konnte in der MBP-Vakzinierung keine Veränderung der Schubaktivität erreicht werden, jedoch verbesserten sich MRT-Parameter und verringerten sich intrathekale gegen Myelin gerichtete Autoantikörper (Garren et al. 2008), bzw. reduzierte T-Zell-Proliferation in Reaktion auf MBP.

5.7.2 T-Zell-Vakzinierungen

Weiterhin wurden bereits in mehreren Studien Vakzinierungen mit attenuierten T-Zellen durchgeführt. Diese T-Zellen waren dabei spezifisch für verschiedene Myelin-Peptide, beispielsweise von MBP, PLP und MOG abgeleitet, bei denen eine mögliche Rolle in der MS vorher gezeigt worden war (Karussis et al. 2012, Loftus et al. 2009). Die Vakzinierungen reduzierten erfolgreich die Zahl der Myelin-reaktiven T-Zellen im Blut (Loftus et al. 2009, Medaer et al. 1995, Zhang et al. 2002) und führte sogar zu einer leichten Reduktion von auftretenden Schüben (Loftus et al. 2009, Medaer et al. 1995, Zhang et al. 2002). Allerdings zeigte sich dieser Effekt teils nicht anhaltend, nach etwa einem Jahr kam es zu einem Wiederanstieg Myelin-reaktiver Zellen (Loftus et al. 2009, Medaer et al. 1995, Zhang et al. 2002). Bisher wurden mit T-Zell-Vakzinen auch zwei doppelblinde randomisierte Studien durchgeführt: Eine bereits vorher getestete Vakzine (Loftus et al. 2009) erzielte positive Effekte, aber keine signifikante klinische

Verbesserung (Fox et al. 2012). Eine andere Studie in Patienten mit schubförmig-progredienter Verlaufsform konnte sogar eine signifikante klinische Verbesserung unter der Therapie mit T-Zell-Vakzinierung gegen verschiedene Myelin-Peptide zeigen (Karussis et al. 2012).

5.7.3 T-Zell-Rezeptor-Peptide

Weiterhin wurden bereits mehrere Studien mit so genannten T-Zell-Rezeptor-Peptiden durchgeführt, bei denen das Ziel die Förderung einer Autoimmunantwort gegen mögliche krankheitsassoziierte T-Zell-Rezeptoren und damit in der Folge eine mögliche Elimination potenzieller autoreaktiver T-Zellen darstellt. Dabei konnten Immunantworten gegen die jeweiligen T-Zell-Rezeptor-Peptide induziert werden (Bourdette et al. 2005, Vandenbaark et al. 1996, Vandenbaark et al. 2008) und teils sogar eine Abnahme Neuroantigen-spezifischer T-Zellen, eine Zunahme des für regulatorische T-Zellen essentiellen Foxp3 oder ein Stillstand der Krankheitsprogression erreicht werden (Vandenbaark et al. 1996, Vandenbaark et al. 2008).

5.7.4 Veränderte Peptidliganden

Mit einem die mittlere Region des Proteins spannenden MBP-Peptid, das in verschiedenen Studien als immundominant und mögliches Autoantigen identifiziert worden war, wurden sogar veränderte Peptidliganden in klinischen Studien getestet. In einer Studie konnte die Immunantwort zu einer Th2-dominierten Antwort hin verschoben werden, musste aber wegen systemischer Hypersensitivitätsreaktionen abgebrochen werden (Kappos et al. 2000). Eine andere Studie dagegen musste beendet werden, da unter dem veränderten Peptidliganden Erkrankungsverschlechterungen auftraten. Bei einem Patienten, der dabei einen Erkrankungsschub erlitt, stieg die Frequenz MBP₈₃₋₉₉-spezifischer T-Zellen während des Schubes enorm an (Bielekova et al. 2000).

5.7.5 Anwendungsmöglichkeiten der getesteten eluierten Peptide

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in der aktiven MS-Erkrankung eine erhöhte Reaktivität gegen verschiedene natürlich eluierte Peptide vorliegt. Dies bedeutet auch, dass die Autoimmunantwort von MS-Patienten sehr heterogen sein kann. In anderen Studien wurden sogar auch fluktuierende Autoimmunantworten auf verschiedene Antigene beobachtet (Saez-Torres et al. 2002). Diese Aspekte

verdeutlichen, dass für die Entwicklung spezifischer kausaler Immuntherapeutika für die Erkrankung mehr potenzielle Autoantigene berücksichtigt werden müssen und womöglich ein auf jeden Patienten zugeschnittenes individuelles Konzept benötigt wird. Grundsätzlich wären die oben beschriebenen Ansätze Antigen-spezifischer Therapien auch auf möglicherweise als Autoantigene fungierende Peptide anwendbar. Natürlich im ZNS von MS-Patienten präsentierte Peptide, wie sie hier untersucht wurden, stellen sicher eine interessante Zielstruktur für eine weitere Erforschung und Einbindung in Antigen-spezifische Therapiekonzepte dar.

6. Zusammenfassung

In Autoimmunerkrankungen wie der multiplen Sklerose wurden der Identifizierung möglicher Autoantigene große Forschungsanstrengungen gewidmet, um eine Grundlage zur Entwicklung kausaler Therapieoptionen zu schaffen. Jedoch sind die Zielstrukturen des Autoimmunprozesses weiterhin nicht vollkommen klar.

In der vorliegenden Arbeit wurden Autoimmunantworten gegen Peptide untersucht, die im ZNS von MS-Patienten natürlich präsentiert werden. Von den 15 getesteten Peptiden waren elf von MHC-II-Molekülen, eines in zwei Teilen von MHC-II-Molekülen und drei von MHC-I-Molekülen in Autopsieproben von MS-Patienten eluiert und durch Massenspektrometrie identifiziert worden. Mittels ELISpot-Versuchen wurde die Zahl spezifischer IFN- γ -sezernierender mononukleärer Zellen des peripheren Bluts gegenüber den Peptiden bestimmt. Interessanterweise zeigte sich eine vermehrte Immunreaktion gegen die getesteten Peptide korrelierend mit der Erkrankungsaktivität. In Patienten mit aktiver MS-Erkrankung zeigten sich signifikante Erhöhungen Peptid-spezifischer IFN- γ -sezernierender Zellen gegenüber inaktiver MS-Erkrankung und bei der Einordnung der IFN- γ -Reaktivitäten in positive und negative Reaktionen signifikant mehr positive Reaktionen auf die getesteten Peptide gegenüber Patienten mit inaktiver MS und Kontrollpersonen. Diese Unterschiede ließen sich nicht durch eine generelle Hyperreaktivität des Immunsystems erklären. Die Peptide, die den größten Unterschied an IFN- γ -Sekretion zwischen aktiver und inaktiver Erkrankung auslösten, waren von Survivin und Myelin-Basischem Protein abgeleitet. Myelin-Basisches Protein wird im Gegensatz zu Survivin schon lange als Autoantigen in der MS diskutiert, Autoimmunreaktionen gegen Survivin wurden bisher in der MS nicht beschrieben. In den Autoimmunreaktionen zeigte sich kein Zusammenhang mit dem DRB1*1501-Trägerstatus. Von diesem HLA-Molekül, das den bedeutendsten genetischen Risikofaktor für die Erkrankung darstellt, waren die meisten der getesteten Peptide eluiert worden. Zusammenfassend gibt die Arbeit Hinweise darauf, dass die beschriebenen natürlich eluierten Peptide als Autoantigene in der Erkrankung fungieren könnten, sei es als primäre Autoantigene oder erst im Rahmen von Immunprozessen wie Epitope Spreading. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass die Immunantwort bei der MS sehr heterogen sein kann, was für eine künftig möglicherweise stattfindende Entwicklung individualisierter Therapieoptionen bedacht werden muss.

7. Anhang

Tabelle 5: Charakteristika der teilnehmenden MS-Patienten

ID	Alter	Ge- schlecht	Erkran- kungs- form	Dauer der Erkran- kung	Aktivität der Erkran- kung	HLA- DRB1* 1501	Oligo- klonale Banden	Immun- modulatorische Medikation	Begleit- erkrankungen
MS27	23	w	RR-MS	8 M.	inaktiv	negativ	positiv	Avonex	Harnwegsinfekt
MS28	43	w	RR-MS	6 M.	inaktiv	positiv (X0)	positiv	Glatirameracetat	Meningeom, Z.n.Gangliogliom
MS29	46	w	RR-MS	7.5 J.	inaktiv	negativ	positiv	Extavia	keine bekannt
MS1	38	w	RR-MS	7.5 J.	inaktiv	positiv (XX)	positiv	keine	Kavernom
MS30	56	m	SP-MS	14.5 J.	inaktiv	negativ	positiv	intermittierend Glukokortikoide	keine bekannt
MS31	54	m	PP-MS	7 J.	inaktiv	negativ	positiv	keine	keine bekannt
MS32	46	w	RR-MS	2 J.	inaktiv	positiv (X0)	positiv	keine	keine bekannt
MS33	30	w	RR-MS	5 J.	inaktiv	negativ	positiv	Avonex	M. Crohn
MS34	56	w	RR-MS	20 J.	inaktiv	positiv (XX)	positiv	Avonex	keine bekannt

ID	Alter	Ge- schlecht	Erkran- kungs- form	Dauer der Erkran- kung	Aktivität der Erkran- kung	HLA- DRB1* 1501	Oligo- klonale Banden	Immun- modulatorische Medikation	Begleit- erkrankungen
MS35	46	m	RR-MS	6 J.	inaktiv	negativ	positiv	Natalizumab	keine bekannt
MS36	38	m	RR-MS	8.5 J.	inaktiv	positiv (X0)	positiv	Natalizumab	Depression
MS37	28	m	CIS	6 M.	inaktiv	negativ	positiv	Avonex	keine bekannt
MS5	42	w	RR-MS (1° Man.)	5 M.	inaktiv	negativ	positiv	Avonex	unklare Arrhythmien
MS38	33	w	RR-MS	4.5 J.	inaktiv	negativ	positiv	Natalizumab	keine bekannt
MS39	54	m	RR-MS	9 M.	inaktiv	negativ	positiv	keine	Migräne
MS6	36	m	RR-MS	8 M.	inaktiv	negativ	positiv	Rebif	Arterielle Hypertonie
MS40	42	w	CIS	10 M.	inaktiv	negativ	positiv	keine	keine bekannt
MS7	36	w	CIS	3 M.	inaktiv	negativ	negativ	keine	Hypothyreose
MS41	56	m	PP-MS	6 J.	inaktiv	positiv (X0)	positiv	intermittierend Glukokortikoide	Arterielle Hypertonie
MS42	35	w	RR-MS	7 J.	inaktiv	negativ	positiv	Glatirameracetat	keine bekannt
MS43	55	w	RR-MS	22 J.	inaktiv	negativ	positiv	Glatirameracetat	keine bekannt
MS44	63	w	RR-MS	4 J.	inaktiv	negativ	positiv	Betaferon	keine bekannt

ID	Alter	Ge- schlecht	Erkran- kungs- form	Dauer der Erkran- kung	Aktivität der Erkran- kung	HLA- DRB1* 1501	Oligo- klonale Banden	Immun- modulatorische Medikation	Begleit- erkrankungen
MS45	33	w	RR-MS	1.5 J.	inaktiv	positiv (X0)	positiv	Glatirameracetat	keine bekannt
MS46	62	m	PP-MS	10 J.	inaktiv	negativ	positiv	keine	Hypothyreose
MS47	40	m	PP-MS	4 J.	inaktiv	negativ	positiv	keine	keine bekannt
MS48	68	m	PP-MS	8 J.	inaktiv	negativ	positiv	keine	keine bekannt
MS49	24	w	RR-MS	2.5 J	inaktiv	positiv (X0)	positiv	Fingolimod	keine bekannt
MS50	46	m	RR-MS	15 J	inaktiv	positiv (X0)	positiv	Avonex	Kongenitaler Hydrocephalus
MS51	59	w	RR-MS	36 J	inaktiv	positiv (X0)	unbe- kannt	keine	keine bekannt
MS1	38	w	RR-MS	8 J.	aktiv	positiv (XX)	positiv	keine	Kavernom
MS2	40	w	SP-MS	10 J.	aktiv	positiv (X0)	positiv	keine	Arterielle Hypertonie
MS3	44	m	RR-MS	20 J.	aktiv	negativ	positiv	keine	keine bekannt

ID	Alter	Ge- schlecht	Erkran- kungs- form	Dauer der Erkran- kung	Aktivität der Erkran- kung	HLA- DRB1* 1501	Oligo- klonale Banden	Immun- modulatorische Medikation	Begleit- erkrankungen
MS4	31	w	RR-MS (1° Man.)	-----	aktiv	negativ	positiv	keine	Depression
MS5	42	w	RR-MS (1° Man.)	-----	aktiv	negativ	positiv	keine	Unklare Arrhythmien
MS6	36	m	RR-MS	6 M.	aktiv	negativ	positiv	Rebif	Arterielle Hypertonie
MS7	36	w	CIS	-----	aktiv	negativ	negativ	keine	Hypothyreose
MS8	51	w	CIS	-----	aktiv	positiv (X0)	negativ	keine	keine bekannt
MS9	45	m	CIS	-----	aktiv	negativ	positiv	keine	Vorhofflimmern
MS10	19	w	CIS	-----	aktiv	negativ	negativ	keine	keine bekannt
MS11	42	w	RR-MS	12 J.	aktiv	positiv (X0)	unbe- kannt	Extavia	keine bekannt
MS12	32	w	CIS	-----	aktiv	negativ	positiv	keine	Hashimoto- Thyreoiditis
MS13	32	m	RR-MS	1.5 J	aktiv	negativ	positiv	Avonex	keine bekannt
MS14	19	w	RR-MS	4 J.	aktiv	negativ	positiv	keine	keine bekannt

ID	Alter	Ge- schlecht	Erkran- kungs- form	Dauer der Erkran- kung	Aktivität der Erkran- kung	HLA- DRB1* 1501	Oligo- klonale Banden	Immun- modulatorische Medikation	Begleit- erkrankungen
MS15	24	w	CIS	-----	aktiv	negativ	negativ	keine	Sichelzell- anämie, Z.n. Splenektomie
MS16	44	m	SP-MS	7 J.	aktiv	negativ	unbe- kannt	keine	keine bekannt
MS17	23	w	RR-MS	5 J.	aktiv	negativ	negativ	keine	keine bekannt
MS18	57	w	SP-MS	17 J.	aktiv	positiv (X0)	positiv	keine	keine bekannt
MS19	24	w	RR-MS (1° Man.)	-----	aktiv	positiv (XX)	positiv	keine	keine bekannt
MS20	36	w	RR-MS (1° Man.)	-----	aktiv	positiv (XX)	positiv	Dimethyl- fumarat	Psoriasis
MS21	23	w	CIS	-----	aktiv	negativ	positiv	keine	keine bekannt

ID	Alter	Ge- schlecht	Erkran- kungs- form	Dauer der Erkran- kung	Aktivität der Erkran- kung	HLA- DRB1* 1501	Oligo- klonale Banden	Immun- modulatorische Medikation	Begleit- erkrankungen
MS22	66	w	SP-MS	43 J.	aktiv	positiv (X0)	negativ	keine	Latente HBV- Infektion, De- menz, arterielle Hypertonie, Glaukom
MS23	26	w	RR-MS	11 J.	aktiv	positiv (X0)	positiv	keine	keine bekannt
MS24	33	w	RR-MS (1° Man.)	-----	aktiv	positiv (X0)	positiv	keine	keine bekannt
MS25	50	m	RR-MS (1° Man.)	-----	aktiv	positiv (X0)	positiv	keine	keine bekannt
MS26	55	w	RR-MS	4 J.	aktiv	positiv (XX)	positiv	keine	WPW-Syndrom

Erläuterungen zu Tabelle 5

XX: homozygot für DRB1*1501. X0: heterozygot für DRB1*1501.

1° Man.: Erstmanifestation der Erkrankung

Die Patienten MS1, MS5, MS6 und MS7 wurden zwei Mal, jeweils bei aktiver und inaktiver Erkrankung, getestet.

Tabelle 6: Charakteristika der Kontrollpersonen

ID	Alter	Ge- schlecht	Diagnose	HLA- DRB1* 1501	Oligo- klonale Banden	Immun- modulatorische Medikation	Begleit- erkrankungen
HC1	49	m	gesund	negativ	unbekannt	keine	keine bekannt
HC2	23	w	gesund	negativ	unbekannt	keine	keine bekannt
HC3	18	w	gesund	negativ	unbekannt	keine	keine bekannt
HC4	23	m	gesund	negativ	unbekannt	keine	keine bekannt
HC5	34	w	gesund	negativ	unbekannt	keine	keine bekannt
HC6	31	w	gesund	negativ	unbekannt	keine	keine bekannt
HC7	28	m	gesund	negativ	unbekannt	keine	keine bekannt
HC8	49	w	gesund	positiv (X0)	unbekannt	keine	keine bekannt
HC9	35	w	gesund	negativ	unbekannt	keine	keine bekannt
HC10	25	w	gesund	negativ	unbekannt	keine	keine bekannt
HC11	32	m	gesund	negativ	unbekannt	keine	keine bekannt
HC12	48	w	gesund	positiv (X0)	unbekannt	keine	keine bekannt
HC13	28	m	gesund	positiv (X0)	unbekannt	keine	keine bekannt

ID	Alter	Ge- schlecht	Diagnose	HLA- DRB1* 1501	Oligo- klonale Banden	Immun- modulatorische Medikation	Begleit- erkrankungen
OND1	34	w	Kavernom	negativ	negativ	keine	keine bekannt
OND2	57	w	Paraneoplastisches Stiff-man-Syndrom	positiv (X0)	unbekannt	keine	Arterielle Hypertonie, perniziöse Anämie, Hashimoto- Thyreoiditis
OND3	53	m	Limbische Enzephalitis	negativ	negativ	IVIG bis zwei Wochen zuvor	Hypothyreose
OND4	25	w	Parästhesien, Hyperventilations- tetanie	negativ	negativ	keine	Supra- ventrikuläre Tachykardie
OND5	52	w	Schwindel	negativ	negativ	keine	keine bekannt

8. Literaturverzeichnis

Ackerman AL, Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* (2004) 5:687-684. doi:10.1038/ni1082

Adamopoulou E, Tenzer S, Hillen N, Klug P, Rota IA, Tietz S, Gebhardt M, Stevanovic S, Schild H, Tolosa E, Melms A, Stoeckle C. Exploring the MHC-peptide matrix of central tolerance in the human thymus. *Nat Commun* (2013) 4:2039. doi:10.1038/ncomms3039

Aly L, Yousef S, Schippling S, Jelcic I, Breiden P, Matschke J, Schulz R, Bofill-Mas S, Jones L, Demina V, Linnebank M, Ogg G, Girones R, Weber T, Sospedra M, Martin R. Central role of JC virus-specific CD4⁺ lymphocytes in progressive multi-focal leucoencephalopathy-immune reconstitution inflammatory syndrome. *Brain* (2011) 134:2687–2702. doi:10.1093/brain/awr206

Antonelou RC, Emmanouilidou E, Gasparinatos G, Velona T, Voumvourakis KI, Stefanis L. Decreased levels of alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *J Neurochem* (2015) 134:748–755. doi:10.1111/jnc.13163

Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, van Kaer L, Pircher HP, Zinkernagel RM, Tonegawa S. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* (1994) 76:651–63.

Avsar T, Korkmaz D, Tütüncü M, Demirci NO, Saip S, Kamasak M, Siva A, Turanlı ET. Protein biomarkers for multiple sclerosis: semi-quantitative analysis of cerebrospinal fluid candidate protein biomarkers in different forms of multiple sclerosis. *Mult Scler* (2012) 18:1081–91. doi:10.1177/1352458511433303

Axelsson M, Malmeström C, Nilsson S, Haghighi S, Rosengren L, Lycke J. Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis. *J Neurol* (2011) 258:882-8. doi:10.1007/s00415-010-5863-2

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* (2000) 192:393–404. doi:10.1084/jem.192.3.393

Bagos PG, Nikolopoulos G, Ioannidis A. Chlamydia pneumoniae infection and the risk of multiple sclerosis. A meta-analysis. *Mult Scler* (2006) 12:397–411. doi:10.1191/1352458506ms1291oa

Balashov KE, Khoury SJ, Hafler DA, Weiner HL. Inhibition of T cell responses by activated human CD8+ T cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest* (1995) 95:2711-9. doi:10.1172/JCI117973

Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, Goodin DS, Pelletier D, Lincoln RR, Bucher P, Swerdlin A, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL, Multiple Sclerosis Genetics Group. HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am J Hum Genet* (2003) 72:710-6. doi:10.1086/367781

Bar-Or A, Vollmer T, Antel J, Arnold DL, Bodner CA, Campagnolo D, Gianettoni J, Jalili F, Kachuck N, Lapierre Y, Niino M, Oger J, Price M, Rhodes S, Robinson WH, Shi FD, Utz PJ, Valone F, Weiner L, Steinman L, Garren H. Induction of antigen-specific tolerance in multiple sclerosis after immunization with DNA encoding myelin basic protein in a randomized, placebo-controlled phase. *Arch Neurol-Chicago* (2007) 64:1407-15. doi:10.1001/archneur.64.10.nct70002

Bartos A, Fialová L, Soukupová J, Kukul J, Malbohan I, Pit'ha J. Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis. *J Neurol* (2007) 254:20-5. doi:10.1007/s00415-006-0185-0

Bartosik-Psujek H, Psujek M, Jaworski J, Stelmasiak Z. Total tau and S100b proteins in different types of multiple sclerosis and during immunosuppressive treatment with mitoxantrone. *Acta Neurol Scand* (2011) 123:252-6. doi:10.1111/j.1600-0404.2010.01393.x

Becher B, Giacomini PS, Pelletier D, McCreia E, Prat A, Antel JP. Interferon-gamma secretion by peripheral blood T-cell subsets in multiple sclerosis: correlation with disease phase and interferon-beta therapy. *Ann Neurol* (1999) 45:247–50.

Bielekova B, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G, Gran B, Eaton J, Antel J, Frank JA, McFarland HF, Martin R. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* (2000) 6:1167–75. doi:10.1038/80516

Bielekova B, Sung M, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* (2004) 172:3893–904. doi:10.4049/jimmunol.172.6.3893

Bourdette DN, Edmonds E, Smith C, Bowen JD, Guttmann CR, Nagy ZP, Simon J, Whitham R, Lovera J, Yadav V, Mass M, Spencer L, Culbertson N, Bartholomew RM, Theofan G, Milano J, Offner H, Vandenbark AA. A highly immunogenic trivalent T cell receptor peptide vaccine for multiple sclerosis. *Mult Scler* (2005) 11:552-61. doi:10.1191/1352458505ms1225oa

Boyum A. Separation of white blood cells. *Nature* (1964) 204:793–794.

Bozzacco L, Yu H, Zebroski HA, Dengjel J, Deng H, Mojsov S, Steinman RM. Mass spectrometry analysis and quantitation of peptides presented on the MHC II molecules of mouse spleen dendritic cells. *J Proteome Res* (2011) 10:5016–30. doi:10.1021/pr200503g

Buljevac D, Verkooyen RP, Jacobs BC, Hop W, van der Zwaan LA, van Doorn PA, Hintzen RQ (2003): Chlamydia pneumoniae and the risk for exacerbation in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* (2003) 54:828–31. doi:10.1002/ana.10759

Bull M, Lee D, Stucky J, Chiu Y-L, Rubin A, Horton H, McElrath MJ. Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. *J Immunol Methods* (2007) 322:57–69. doi:10.1016/j.jim.2007.02.003

Burns JB, Bartholomew BD, Lobo ST. Isolation of CD45RO+, memory T cells recognizing proteolipid protein from neurologically normal subjects. *Cell Immunol* (2001) 212:44–50. doi:10.1006/cimm.2001.1842

Castegna A, Palmieri L, Spera I, Porcelli V, Palmieri F, Fabis-Pedrini MJ, Kean RB, Barkhouse DA, Curtis MT, Hooper DC. Oxidative stress and reduced glutamine synthetase activity in the absence of inflammation in the cortex of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Neuroscience* (2011) 185:97–105. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.04.041

Chicz RM. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* (1993) 178:27–47. doi:10.1084/jem.178.1.27

Chou YK, Bourdette DN, Offner H, Whitham R, Wang RY, Hashim GA, Vandenberg AA. Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* (1992) 38:105-13.

Conway EM, Zwerts F, Van Eygen V, DeVriese A, Nagai N, Luo W, Collen D. Survivin-Dependent Angiogenesis in Ischemic Brain. *Am J Pathol* (2003) 163:935-46. doi:10.1016/S0002-9440(10)63453-0

Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, Stastny P, Douek DC, Koup RA, Rucke MK, Karandikar NJ. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* (2004) 103:4222-31. doi:10.1182/blood-2003-11-4025

Cunnusamy K, Baughman EJ, Franco J, Ortega SB, Sinha S, Chaudhary P, Greenberg BM, Frohman EM, Karandikar NJ. Disease exacerbation of multiple sclerosis is characterized by loss of terminally differentiated autoregulatory CD8+ T cells. *Clin Immunol* (2014) 152:115–26. doi:10.1016/j.clim.2014.03.005

Dang M, Rockell J, Wagner R, Wenzlau JM, Yu L, Hutton JC, Gottlieb PA, Davidson HW. Human type 1 diabetes is associated with T cell autoimmunity to zinc transporter 8. *J Immunol* (2011) 186:6056–63. doi:10.4049/jimmunol.1003815

Davies S, Nicholson T, Laura M, Giovannoni G, Altmann DM. Spread of T lymphocyte immune responses to myelin epitopes with duration of multiple sclerosis. *J Neuropath Exp Neur* (2005) 64:371-7. doi:10.1093/jnen/64.5.371

De Graaf KL, Weissert R, Kjellén P, Holmdahl R, Olsson T. Allelic variations in rat MHC class II binding of myelin basic protein peptides correlate with encephalitogenicity. *Int Immunol* (1999) 11:1981–88.

Doherty TM, Demissie A, Menzies D, Andersen P, Rook G, Zumla A. Effect of sample handling on analysis of cytokine responses to *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using ELISA, ELISPOT and quantitative PCR. *J Immunol Methods* (2005) 298:129–41. doi:10.1016/j.jim.2005.01.013

Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell B* (2001) 33:637-68. doi:10.1016/S1357-2725(01)00046-2

Du Pasquier RA, Stein MC, Lima MA, Dang X, Jean-Jacques J, Zheng Y, Letvin NL, Koralnik IJ. JC virus induces a vigorous CD8+ cytotoxic T cell response in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* (2006) 176:181–186. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.04.003

Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, Ferrero B, Eid P, Novelli F. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol* (2009) 65:499-509. doi:10.1002/ana.21652

Eikelenboom MJ, Petzold A, Lazeron RH, Silber E, Sharief M, Thompson EJ, Barkhof F, Giovannoni G, Polman CH, Uitdehaag BM. Multiple sclerosis: Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurology* (2003) 60:219-23.

Engelhard VH. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* (1994) 12:181–207. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001145

Ettle B, Kuhbandner K, Jörg S, Hoffmann A, Winkler J, Linker RA. α -Synuclein deficiency promotes neuroinflammation by increasing Th1 cell-mediated immune responses. *J Neuroinflammation* (2016) 13:201. doi:10.1186/s12974-016-0694-4

Fissolo N, Haag S, de Graaf KL, Drews O, Stevanovic S, Rammensee HG, Weissert R. Naturally presented peptides on major histocompatibility complex I and II molecules eluted from central nervous system of multiple sclerosis patients. *Mol Cell Proteomics* (2009) 8:2090–101. doi:10.1074/mcp.M900001-MCP200

Flachenecker P, Stuke K, Elias W, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, Schimrigk S, Zettl UK, Rieckmann P. Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006. *Dtsch Arztebl Int* (2008) 105:113-9. doi:10.3238/arztebl.2008.0113

Fox E, Wynn D, Cohan S, Rill D, McGuire D, Markowitz C. A randomized clinical trial of autologous T-cell therapy in multiple sclerosis: subset analysis and implications for trial design. *Mult Scler* (2012)18:843-52. doi:10.1177/1352458511428462

Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* (2006) 5:1087-98. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0375

Garren H, Robinson WH, Krasulová E, Havrdová E, Nadj C, Selmaj K, Losy J, Nadj I, Radue EW, Kidd BA, Gianettoni J, Tersini K, Utz PJ, Valone F, Steinman L, BHT-3009 Study Group. Phase 2 trial of a DNA vaccine encoding myelin basic protein for multiple sclerosis. *Ann Neurol* (2008) 63:611-20. doi:10.1002/ana.21370

Goebels N, Hofstetter H, Schmidt S, Brunner C, Wekerle H, Hohlfeld R. Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence. *Brain* (2000) 123:508–18. doi:10.1093/brain/123.3.508

Gonsette RE. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci* (2008) 274:48-53. doi:10.1016/j.jns.2008.06.029

Goris A, Walton A, Ban M, Dubois B, Compston A, Sawcer S. A Taqman assay for high-throughput genotyping of the multiple sclerosis-associated HLA-DRB1*1501 allele. *Tissue Antigens* (2008) 72:401–403. doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01101.x

Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* (2009) 9:393–407. doi:10.1038/nri2550

Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Hanning U, Posevitz-Fejfar A, Korsukewitz C, Schwab N, Meuth SG, Wiendl H, Klotz L. Distinct pattern of lesion distribution in multiple sclerosis is associated with different circulating T-helper and helper-like innate lymphoid cell subsets. *Mult Scler* (2017) 23:1025-1030. doi:10.1177/1352458516662726

Hardin-Pouzet H, Krakowski M, Bourbonnière L, Didier-Bazes M, Tran E, Owens T. Glutamate metabolism is down-regulated in astrocytes during experimental allergic encephalomyelitis. *Glia* (1997) 20:79-85.

Haring JS, Pewe LL, Perlman S. Bystander CD8 T cell-mediated demyelination after viral infection of the central nervous system. *J Immunol* (2002) 169:1550–5. doi:10.4049/jimmunol.169.3.1550

Hebb ALO, Moore CS, Bhan V, Campbell T, Fisk JD, Robertson HA Thorne M, Lacasse E, Holcik M, Gillard J, Crocker SJ, Robertson GS. Expression of the inhibitor of apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during autoimmune mediated demyelination. *Mult Scler* (2008) 14:577–94. doi:10.1177/1352458507087468

Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Lund H, Sellebjerg F, Nielsen CH. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology* (2008) 125:161–9. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02837.x

Hein Née Maier K, Köhler A, Diem R, Sättler MB, Demmer I, Lange P, Bähr M, Otto M. Biological markers for axonal degeneration in CSF and blood of patients with the first event indicative for multiple sclerosis. *Neurosci Lett* (2008) 436:72-6. doi:10.1016/j.neulet.2008.02.064

Hellings N, Barée M, Verhoeven C, D'hooghe MB, Medaer R, Bernard CC, Raus J, Stinissen P. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res* (2001) 63:290-302. doi:10.1002/1097-4547(20010201)63:3<290::AID-JNR1023>3.0.CO;2-4

Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* (2007) 68:326-37. doi:10.1212/01.wnl.0000252807.38124.a3

Huang J, Ehrnfelt C, Paulie S, Zuber B, Ahlborg N. ELISpot and ELISA analyses of human IL-21-secreting cells. Impact of blocking IL-21 interaction with cellular receptors. *J Immunol Methods* (2015) 417:60–66. doi:10.1016/j.jim.2014.12.007

Huizinga R, Hintzen RQ, Assink K, van Meurs M, Amor S. T-cell responses to neurofilament light protein are part of the normal immune repertoire. *Int Immunol* (2009) 21:433-41. doi:10.1093/intimm/dxp011

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45:1353–1360. doi:10.1038/ng.2770

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* (2011) 476:214–9. doi:10.1038/nature10251

Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, Schock S, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B. Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* (2002) 125:538-50. doi:10.1093/brain/awf059

Jiang Y, de Bruin A, Caldas H, Fangusaro J, Hayes J, Conway EM, Robinson ML, Altura RA. Essential role for survivin in early brain development. *J Neurosci* (2005) 25:6962-70. doi:10.1523/JNEUROSCI.1446-05.2005

Jingwu Z, Medaer R, Hashim GA, Chin Y, van den Berg-Loonen E, Raus JC. Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and controls: precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity. *Ann Neurol* (1992) 32:330-8. doi:10.1002/ana.410320305

Johnson MC, Pierson ER, Spieker AJ, Nielsen AS, Posso S, Kita M, Buckner JH, Goverman JM. Distinct T cell signatures define subsets of patients with multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* (2016) 3:e278. doi:10.1212/NXI.0000000000000278

Jones EY, Fugger L, Strominger JL, Siebold C. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat Rev Immunol* (2006) 6:271–82. doi:10.1038/nri1805

Jongen PJ, Lamers KJ, Doesburg WH, Lemmens WA, Hommes OR. Cerebrospinal fluid analysis differentiates between relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Ps* (1997) 63:446-51.

Kappos L, Comi G, Panitch H, Oger J, Antel J, Conlon P, Steinman L. Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The altered peptide ligand in relapsing MS study group. *Nat Med* (2000) 6:1176–82. doi:10.1038/80525

Karussis D, Shor H, Yachnin J, Lanxner N, Amiel M, Baruch K, Keren-Zur Y, Haviv O, Filippi M, Petrou P, Hajag S, Vourka-Karussis U, Vaknin-Dembinsky A, Khoury S, Abramsky O, Atlan H, Cohen IR, Abulafia-Lapid R. T cell vaccination benefits relapsing progressive multiple sclerosis patients: a randomized, double-blind clinical trial. *PLoS One* (2012) 7:e50478. doi:10.1371/journal.pone.0050478

Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, Duquette P, Prat A. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* (2009) 66:390-402. doi:10.1002/ana.21748

Kirschmann DA, Duffin KL, Smith CE, Welply JK, Howard SC, Schwartz BD, Woulfe SL. Naturally processed peptides from rheumatoid arthritis associated and non-associated HLA-DR alleles. *J Immunol* (1995) 155:5655–62.

Kojima K, Berger T, Lassmann H, Hinze-Selch D, Zhang Y, Gehrman J, Reske K, Wekerle H, Linington C. 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* (1994) 180:817-29.

Krogsgaard M, Wucherpfennig KW, Cannella B, Hansen BE, Svejgaard A, Pyrdol J, et al. Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J Exp Med* (2000) 191:1395–412. doi:10.1084/jem.191.8.1395

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* (2007) 17:210–8. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x

Lenz DC, Lu L, Conant SB, Wolf NA, Gérard HC, Whittum-Hudson JA, Hudson AP, Swanborg RH. A *Chlamydia pneumoniae*-specific peptide induces experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J Immunol* (2001) 167:1803–08.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* (1998) 396:580–4. doi:10.1038/25141.

Lim ET, Petzold A, Leary SM, Altmann DR, Keir G, Thompson EJ, Miller DH, Thompson AJ, Giovannoni G. Serum S100B in primary progressive multiple sclerosis patients treated with interferon-beta-1a. *J Negat Results Biomed* (2004) 3:4. doi:10.1186/1477-5751-3-4

Lion E, Smits ELJM, Berneman ZN, van Tendeloo VFI. Quantification of IFN-gamma produced by human purified NK cells following tumor cell stimulation. Comparison of three IFN-gamma assays. *J Immunol Methods* (2009) 350:89–96. doi:10.1016/j.jim.2009.08.014

Liu GY, Fairchild PJ, Smith RM, Prowle JR, Kioussis D, Wraith DC. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* (1995) 3:407-15.

Liu GZ, Fang LB, Hjelmström P, Gao XG. Increased CD8+ central memory T cells in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* (2007) 13:149-55. doi:10.1177/1352458506069246

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 SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* (2002) 8:500–8. doi:10.1038/nm0502-500

Loftus B, Newsom B, Montgomery M, Von Gynz-Rekowski K, Riser M, Inman S, Garces P, Rill D, Zhang J, Williams JC. Autologous attenuated T-cell vaccine (Tovaxin) dose escalation in multiple sclerosis relapsing-remitting and secondary progressive patients nonresponsive to approved immunomodulatory therapies. *Clin Immunol* (2009) 131:202–15. doi:10.1016/j.clim.2009.01.005

Lowther DE, Chong DL, Ascough S, Ettore A, Ingram RJ, Boyton RJ, Altmann DM. Th1 not Th17 cells drive spontaneous MS-like disease despite a functional regulatory T cell response. *Acta Neuropathol* (2013) 126:501–15. doi:10.1007/s00401-013-1159-9

Lu JQ, Fan Y, Mitha AP, Bell R, Metz L, Moore GR, Yong VW. Association of alpha-synuclein immunoreactivity with inflammatory activity in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* (2009) 68:179–89. doi:10.1097/NEN.0b013e318196e905

Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol* (2014) 72 Suppl 1:1–5. doi:10.1159/000367614

Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Brück W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* (2011) 365:2188–97. doi:10.1056/NEJMoa1100648

Lycke JN, Karlsson JE, Andersen O, Rosengren LE. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosur Ps* (1998) 64:402–4. doi:10.1136/jnnp.64.3.402

Lysandropoulos AP, Racapé J, Holovska V, Toungouz M. Human leucocyte antigen (HLA) class I and II typing in Belgian multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Belg* (2017) 117:61–5. doi:10.1007/s13760-016-0716-0

Madsen LS, Andersson EC, Jansson L, Krogsgaard M, Andersen CB, Engberg J, Strominger JL, Svejgaard A, Hjorth JP, Holmdahl R, Wucherpfennig KW, Fugger L. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet* (1999) 23:343–7. doi:10.1038/15525

Malmeström C, Haghghi S, Rosengren L, Andersen O, Lycke J. Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology* (2003) 61:1720-5.

Malmeström C, Lycke J, Haghghi S, Andersen O, Carlsson L, Wadenvik H, Olsson B. Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. *J Neuroimmunol* (2008) 196:159–65. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.03.001

Mamula MJ. The inability to process a self-peptide allows autoreactive T cells to escape tolerance. *J Exp Med* (1993) 177:567-71.

Martin R, Howell MD, Jaraquemada D, Flerlage M, Richert J, Brostoff S, Long EO, McFarlin DE, McFarland HF. A myelin basic protein peptide is recognized by cytotoxic T cells in the context of four HLA-DR types associated with multiple sclerosis. *J Exp Med* (1991) 173:19–24. doi:10.1084/jem.173.1.19

Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Matsuoka T, Imamura S, Yamasaki R, Suzuki M, Suenaga T, Iwaki T, Kira J. Connexin 43 astrocytopathy linked to rapidly progressive multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *PLoS One* (2013) 8:e72919. doi:10.1371/journal.pone.0072919

Matthews PM. Primary progressive multiple sclerosis takes centre stage. *J Neurol Neurosur Ps* (2004) 75:1232-3. doi:10.1136/jnnp.2004.044263

Medaer R, Stinissen P, Truyen L, Raus J, Zhang J. Depletion of myelin-basic-protein autoreactive T cells by T-cell vaccination: pilot trial in multiple sclerosis. *Lancet* (1995) 346:807-8.

Meinl E, Weber F, Drexler K, Morelle C, Ott M, Saruhan-Direskeneli G, Goebels N, Ertl B, Jechart G, Giegerich G. Myelin basic protein-specific T lymphocyte repertoire in multiple sclerosis. Complexity of the response and dominance of nested epitopes due to recruitment of multiple T cell clones. *J Clin Invest* (1993) 92:2633-43. doi:10.1172/JCI116879

Melms A, Malcherek G, Gern U, Wiethölter H, Müller CA, Schoepfer R, Lindstrom J. T cells from normal and myasthenic individuals recognize the human acetylcholine receptor: heterogeneity of antigenic sites on the alpha-subunit. *Ann Neurol* (1992) 31:311–8. doi:10.1002/ana.410310314

Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* (2007) 6:903-12. doi:10.1016/S1474-4422(07)70243-0

Missler U, Wandinger KP, Wiesmann M, Kaps M, Wessel K. Acute exacerbation of multiple sclerosis increases plasma levels of S-100 protein. *Acta Neurol Scand* (1997) 96:142-4.

Mitosek-Szewczyk K, Gordon-Krajcer W, Flis D, Stelmasiak Z. Some markers of neuronal damage in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients in relapse. *Folia Neuropathol* (2011) 49:191-6.

Mohme M, Hotz C, Stevanovic S, Binder T, Lee J, Okoniewski M, Eiermann T, Sospedra M, Rammensee HG, Martin R. HLA-DR15-derived self-peptides are involved in increased autologous T cell proliferation in multiple sclerosis. *Brain* (2013) 136:1783–98. doi:10.1093/brain/awt108

Moldovan IR, Rudick RA, Cotleur AC, Born SE, Lee J, Karafa MT, Pelfrey CM. Interferon gamma responses to myelin peptides in multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression. *J Neuroimmunol* (2003) 141:132–40. doi:10.1016/S0165-5728(03)00221-2

Mori F, Tanji K, Yoshimoto M, Takahashi H, Wakabayashi K. Demonstration of alpha-synuclein immunoreactivity in neuronal and glial cytoplasm in normal human brain tissue using proteinase K and formic acid pretreatment. *Exp Neurol* (2002) 176:98–104.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* (1986) 136:2348–57.

Muraro PA, Wandinger K, Bielekova B, Gran B, Marques A, Utz U, McFarland HF, Jacobson S, Martin R. Molecular tracking of antigen-specific T cell clones in neurological immune-mediated disorders. *Brain* (2003) 126:20–31. doi:10.1093/brain/awg021

Nakajima H, Fukuda K, Doi Y, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T, Ikemoto T, Shimizu A. Expression of Th1/Th2-related chemokine receptors on peripheral T cells and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* (2004) 52:162–8. doi:10.1159/000081856

Nakanishi K, Komatsu Y, Kogawa N, Matsushita H. Analysis of eluted peptides from type 1 diabetes-susceptible HLA class II molecules identified novel islet protein, heparin/heparan sulfate-interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) 329:356–61. doi:10.1016/j.bbrc.2005.01.144

Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* (2011) 11:823-36. doi:10.1038/nri3084

Nepom GT, Lippolis JD, White FM, Masewicz S, Marto JA, Herman A, Luckey CJ, Falk B, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Nepom BS. Identification and modulation of a naturally processed T cell epitope from the diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase 65 (hGAD65). *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98:1763–8. doi:10.1073/pnas.98.4.1763

Newcombe J, Woodroffe MN, Cuzner ML. Distribution of glial fibrillary acidic protein in gliosed human white matter. *J Neurochem* (1986) 47:1713-9. doi:10.1111/j.1471-4159.1986.tb13079.x

Norgren N, Rosengren L, Stigbrand T. Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res* (2003) 987:25-31.

Norgren N, Sundström P, Svenningsson A, Rosengren L, Stigbrand T, Gunnarsson M. Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology* (2004) 63:1586-90.

Noronha A, Toscas A, Jensen MA. Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* (1993) 46:145-53.

Olsson T. Cytokines in neuroinflammatory disease: role of myelin autoreactive T cell production of interferon-gamma. *J Neuroimmunol* (1992) 40:211-8. doi:10.1016/0165-5728(92)90135-8

Olsson T, Sun J, Hillert J, Höjeberg B, Ekre HP, Andersson G, Olerup O, Link H. Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* (1992) 22:1083–7. doi:10.1002/eji.1830220431

Olsson T, Zhi WW, Höjeberg B, Kostulas V, Jiang YP, Anderson G, Ekre HP, Link H. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. *J Clin Invest* (1990) 86:981–5. doi:10.1172/JCI114800

Panina-Bordignon P, Tan A, Termijtelen A, Demotz S, Corradin G, Lanzavecchia A. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol* (1989) 19:2237–2242. doi:10.1002/eji.1830191209

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

Papadopoulos D, Ewans L, Pham-Dinh D, Knott J, Reynolds R. Upregulation of alpha-synuclein in neurons and glia in inflammatory demyelinating disease. *Mol Cell Neurosci* (2006) 31:597–612. doi:10.1016/j.mcn.2006.01.007

Paroni M, Maltese V, De Simone M, Ranzani V, Larghi P, Fenoglio C, Pietroboni AM, De Riz MA, Crosti MC, Maglie S, Moro M, Caprioli F, Rossi R, Rossetti G, Galimberti D, Pagani M, Scarpini E, Abrignani S, Geginat J. Recognition of viral and self-antigens by TH1 and TH1/TH17 central memory cells in patients with multiple sclerosis reveals distinct roles in immune surveillance and relapses. *J Allergy Clin Immunol* (2017) pii: S0091-6749(17)30043-X. doi:10.1016/j.jaci.2016.11.045

Peakman M, Stevens EJ, Lohmann T, Narendran P, Dromei J, Alexander A, Tomlinson AJ, Trucco M, Gorga JC, Chiciz RM. Naturally processed and presented epitopes of the islet cell autoantigen IA-2 eluted from HLA-DR4. *J Clin Invest* (1999) 104:1449–57. doi:10.1172/JCI7936

Petzold A, Baker D, Pryce G, Keir G, Thompson EJ, Giovannoni G. Quantification of neurodegeneration by measurement of brain-specific proteins. *J Neuroimmunol* (2003) 138:45-8.

Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* (2000) 6:67–70. doi:10.1038/71555

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis. 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* (2011) 69:292–302. doi:10.1002/ana.22366

Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol* (2012) 7:185–217. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132443

Quintana FJ, Patel B1 Yeste A, Nyirenda M, Kenison J, Rahbari R, Fetco D, Hussain M, O'Mahony J, Magalhaes S, McGowan M, Johnson T, Rajasekharan S, Narayanan S, Arnold DL, Weiner HL, Banwell B1 Bar-Or A, Canadian Pediatric Demyelinating Disease Network. Epitope spreading as an early pathogenic event in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* (2014) 83:2219-26. doi:10.1212/WNL.0000000000001066

Rammensee HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* (1995) 7:85-96.

Rejdak K, Petzold A, Stelmasiak Z, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid brain specific proteins in relation to nitric oxide metabolites during relapse of multiple sclerosis. *Mult Scler* (2008) 14:59-66. doi:10.1177/1352458507082061

Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Increased immune reactivity to central nervous system-derived naturally presented peptides in patients with active multiple sclerosis. *J Allergy Clin Immunol* (2017) 139:694-696. doi:10.1016/j.jaci.2016.08.015

Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Peripheral Blood Mononuclear Cells. Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods Mol Biol* (2016) 1304:53–61. doi:10.1007/7651_2014_99

Ristori G, Giubilei F, Giunti D, Perna A, Gasperini C, Buttinelli C, Salvetti M, Uccelli A. Myelin basic protein intramolecular spreading without disease progression in a patient with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* (2000) 110:240-3.

Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, Oehmichen A, Schmitz M, Mehlhorn J, Conrad K, Rieber EP. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res* (2000) 60:1815-7.

Rosengren LE, Lycke J, Andersen O. Glial fibrillary acidic protein in CSF of multiple sclerosis patients: relation to neurological deficit. *J Neurol Sci* (1995) 133:61-5. doi:10.1016/0022-510X(95)00152-R

Rostasy K, Withut E, Pohl D, Lange P, Ciesielcyk B, Diem R, Gärtner J, Otto M. Tau, phospho-tau, and S-100B in the cerebrospinal fluid of children with multiple sclerosis. *J Child Neurol* (2005) 20:822-5. doi:10.1177/08830738050200100801

Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* (1991) 353:622-7.

Sáez-Torres I, Brieva L, Espejo C, Barrau MA, Montalban X, Martínez-Cáceres EM. Specific proliferation towards myelin antigens in patients with multiple sclerosis during a relapse. *Autoimmunity* (2002) 35:45-50. doi: 10.1080/08916930290005927

Salvetti M, Ristori G, D'Amato M, Buttinelli C, Falcone M, Fieschi C, Wekerle H, Pozzilli C. Predominant and stable T cell responses to regions of myelin basic protein can be detected in individual patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* (1993) 23:1232-9. doi:10.1002/eji.1830230606

Sasaki K, Bean A, Shah S, Schutten E, Huseby PG, Peters B, Shen ZT, Vanguri V, Liggitt D, Huseby ES. Relapsing-remitting central nervous system autoimmunity mediated by GFAP-specific CD8 T cells. *J Immunol* (2014) 192:3029-42. doi:10.4049/jimmunol.1302911

Schmidt S, Linington C, Zipp F, Sotgiu S, de Waal Malefyt R, Wekerle H, Hohlfeld R. Multiple sclerosis: comparison of the human T-cell response to S100 beta and myelin basic protein reveals parallels to rat experimental autoimmune panencephalitis. *Brain* (1997) 120:1437-45.

Schumacher TN, Heemels MT, Neefjes JJ, Kast WM, Melief CJ, Ploegh HL. Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro. *Cell* (1990) 62:563-7.

Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *J Neuroimmunol* (2002) 122:132-9. doi:10.1016/S0165-5728(01)00455-6

Sharief MK, Noori MA, Douglas MR, Semra YK. Upregulated survivin expression in activated T lymphocytes correlates with disease activity in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* (2002a) 9:503–10.

Sharief MK, Semra YK. Down-regulation of survivin expression in T lymphocytes after interferon beta-1a treatment in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol-Chicago* (2002b) 59:1115–21.

Sharief MK, Semra YK. Heightened expression of survivin in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* (2001) 119:358–64.

Shimizu Y, Ota K, Kubo S, Kabasawa C, Kobayashi M, Ohashi T, Uchiyama S. Association of Th1/Th2-related chemokine receptors in peripheral T cells with disease activity in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Eur Neurol* (2011) 66:91-7. doi:10.1159/000329576

Silber E, Semra YK, Gregson NA, Sharief MK. Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurology* (2002) 58:1372-81.

Smestad C, Brynedal B, Jonasdottir G, Lorentzen AR, Masterman T, Akesson E, Spurkland A, Lie BA, Palmgren J, Celius EG, Hillert J, Harbo HF. The impact of HLA-A and -DRB1 on age at onset, disease course and severity in Scandinavian multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* (2007) 14:835-40. doi:10.1111/j.1468-1331.2007.01825.x

Söderström M, Link H, Sun JB, Fredrikson S, Kostulas V, Höjeberg B, Li BL, Olsson T. T cells recognizing multiple peptides of myelin basic protein are found in blood and enriched in cerebrospinal fluid in optic neuritis and multiple sclerosis. *Scand J Immunol* (1993) 37:355-68. doi:10.1111/j.1365-3083.1993.tb02565.x

Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* (2005) 23:683–747. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707

Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Semin Neurol* (2016) 36:115–127. doi:10.1055/s-0036-1579739

Srinivasan R, Sailasuta N, Hurd R, Nelson S, Pelletier D. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain* (2005) 128:1016-25. doi:10.1093/brain/awh467

Sriram S, Ljunggren-Rose A, Yao SY, Whetsell WO Jr. Detection of chlamydial bodies and antigens in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *J Infect Dis* (2005) 192:1219-28. doi:10.1086/431518

Stover JF, Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Lowitzsch K, Kempinski OS. Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. *Eur J Clin Invest* (1997) 27:1038-43.

Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* (2001) Appendix 3:Appendix 3B.DOI: doi:10.1002/0471142735.ima03bs21

Sun J, Link H, Olsson T, Xiao BG, Andersson G, Ekre HP, Linington C, Diener P. T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J Immunol* (1991) 146:1490–5.

Tassignon J, Burny W, Dahmani S, Zhou L, Stordeur P, Byl B, De Groote D. Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid. Comparison of the measurement of IFN-gamma production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR. *J Immunol Methods* (2005) 305:188–198. doi:10.1016/j.jim.2005.07.014

Tejada-Simon MV, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Reactivity pattern and cytokine profile of T cells primed by myelin peptides in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol* (2001) 31:907–17. doi:10.1002/1521-4141(200103)31:3<907::AID-IMMU907>3.0.CO;2-1

Tejada-Simon MV, Zang YC, Yang D, Hong J, Li S, Singh RA, Van den Berg-Loonen E, Killian JM, Rivera VM, Zhang JZ. Aberrant T cell responses to myelin antigens during clinical exacerbation in patients with multiple sclerosis. *Int Immunol* (2000) 12:1641–50. doi:10.1093/intimm/12.12.1641

Teunissen CE, Dijkstra C, Polman C. Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* (2005) 4:32–41. doi:10.1016/S1474-4422(04)00964-0

Thorsby E, Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: genes involved and possible mechanisms. *Transpl Immunol* (2005) 14:175–182. doi:10.1016/j.trim.2005.03.021

Tischer S, Dieks D, Sukdolak C, Bunse C, Figueiredo C, Immenschuh S, Borchers S, Stripecke R, Maecker-Kolhoff B, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. Evaluation of suitable target antigens and immunoassays for high-accuracy immune monitoring of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific T cells as targets of interest in immunotherapeutic approaches. *J Immunol Methods* (2014) 408:101–113. doi:10.1016/j.jim.2014.05.011

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* (1998) 338:278–85. doi:10.1056/NEJM199801293380502

Tuohy VK, Yu M, Weinstock-Guttman B, Kinkel RP. Diversity and plasticity of self recognition during the development of multiple sclerosis. *J Clin Invest* (1997) 99:1682–90. doi:10.1172/JCI119331

Tuohy VK, Yu M, Yin L, Kawczak JA, Johnson JM, Mathisen PM et al. (1998): The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* (1998) 164:93–100.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* (2008) 172:146-55. doi:10.2353/ajpath.2008.070690

Uccelli A, Ristori G, Giunti D, Seri M, Montesperelli C, Caroli F, Solaro C, Murialdo A, Marchese M, Buttinelli C, Mancardi G, Salvetti M. Dynamics of the reactivity to MBP in multiple sclerosis. *J Neurovirol* (2000) 6(Suppl 2):S52–6.

Valli A, Sette A, Kappos L, Oseroff C, Sidney J, Miescher G, et al. Binding of myelin basic protein peptides to human histocompatibility leukocyte antigen class II molecules and their recognition by T cells from multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* (1993) 91:616–28. doi:10.1172/JCI116242

Vandenbark AA, Chou YK, Whitham R, Mass M, Buenafe A, Liefeld D, Kavanagh D, Cooper S, Hashim GA, Offner H. Treatment of multiple sclerosis with T-cell receptor peptides: results of a double-blind pilot trial. *Nat Med* (1996) 2:1109-15.

Vandenbark AA, Culbertson NE, Bartholomew RM, Huan J, Agotsch M, LaTocha D, Yadav V, Mass M, Whitham R, Lovera J, Milano J, Theofan G, Chou YK, Offner H, Bourdette DN. Therapeutic vaccination with a trivalent T-cell receptor (TCR) peptide vaccine restores deficient FoxP3 expression and TCR recognition in subjects with multiple sclerosis. *Immunology* (2008) 123:66-78. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02703.x

Venken K, Hellings N, Hensen K, Rummens J, Stinissen P. Memory CD4+CD127high T cells from patients with multiple sclerosis produce IL-17 in response to myelin antigens. *J Neuroimmunol* (2010) 226:185–91. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.05.025

Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R. Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J Immunol* (1994) 153:1665–73.

Wallström E, Khademi M, Andersson M, Weissert R, Linington C, Olsson T. Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15)+ multiple sclerosis. *Eur J Immunol* (1998) 28:3329–35. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3329::AID-IMMU3329>3.0.CO;2-B

Wang H, Wang K, Xu W, Wang C, Qiu W, Zhong X, Dai Y, Wu A, Hu X. Cerebrospinal fluid α -synuclein levels are elevated in multiple sclerosis and neuromyelitis optica patients during relapse. *J Neurochem* (2012) 122:19-23. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07749.x

Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Matsushita T, Suzumura A, Kira JI. Th1 cells downregulate connexin 43 gap junctions in astrocytes via microglial activation. *Sci Rep* (2016) 6:38387. doi:10.1038/srep38387

Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* (1989) 112:133-46.

Werner P, Pitt D, Raine CS. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* (2001) 50:169-80.

Wing AC, Hygino J, Ferreira TB, Kasahara TM, Barros PO, Sacramento PM, Andrade RM, Camargo S, Rueda F, Alves-Leon SV, Vasconcelos CC, Alvarenga R, Bento CA. Interleukin-17- and interleukin-22-secreting myelin-specific CD4(+) T cells resistant to corticoids are related with active brain lesions in multiple sclerosis patients. *Immunology* (2016) 147:212-20. doi:10.1111/imm.12552

Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* (1995) 80:695–705. doi:10.1016/0092-8674(95)90348-8

Zang YCQ, Li S, Rivera VM, Hong J, Robinson RR, Breitbach WT, Killian J, Zhang JZ. Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol* (2004) 172:5120–7. doi:10.4049/jimmunol.172.8.5120

Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* (1994) 179:973–84. doi:10.1084/jem.179.3.973

Zhang JZ, Rivera VM, Tejada-Simon MV, Yang D, Hong J, Li S, Haykal H, Killian J, Zang YC. T cell vaccination in multiple sclerosis: results of a preliminary study. *J Neurol* (2002) 249:212-8.

Zhang Q, Lin CY, Dong Q, Wang J, Wang W. Relationship between HLA-DRB1 polymorphism and susceptibility or resistance to multiple sclerosis in Caucasians: a meta-analysis of non-family-based studies. *Autoimmun Rev* (2011) 10:474-81. doi:10.1016/j.autrev.2011.03.003

Zuber B, Levitsky V, Jönsson G, Paulie S, Samarina A, Grundström S, Metkar S, Norell H, Callender GG, Froelich C, Ahlborg N. Detection of human perforin by ELISpot and ELISA: ex vivo identification of virus-specific cells. *J Immunol Methods* (2005) 302:13–25. doi:10.1016/j.jim.2005.04.015

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich des IFN- γ - Nachweises in ELISpot und ELISA	42
Abbildung 2: Standardreihe IFN- γ ELISA	43
Abbildung 3: Spezifische IFN- γ -produzierende Zellen in MS-Patienten und Kontrollpersonen nach Stimulation mit eluierten Peptiden	45
Abbildung 4: Spezifische IFN- γ -produzierende Zellen in Patienten mit aktiver und inaktiver MS und Kontrollpersonen nach Stimulation mit eluierten Peptiden	46
Abbildung 5: Spezifische IFN- γ -produzierende Zellen in verschiedenen MS- Erkrankungsformen und Kontrollpersonen nach Stimulation mit eluierten Peptiden.....	48
Abbildung 6: Positive Reaktionen gegen eluierte Peptide in aktiver und inaktiver MS und Kontrollpersonen im Vergleich.....	49
Abbildung 7: Spezifische IFN- γ -produzierende Zellen unter Berücksichtigung des HLA-DRB1*1501-Trägerstatus nach Stimulation mit von HLA- DRB1*1501 eluierten Peptiden.....	54
Abbildung 8: Übersicht über die getesteten MBP-Peptide	63

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Getestete eluierte Peptide	33
Tabelle 2: Getestete Kontrollpeptide	36
Tabelle 3: Zahl positiver Peptide	50
Tabelle 4: Frequenzen IFN- γ -produzierender PBMZ pro 10^5 PBMZ	52
Tabelle 5: Charakteristika der teilnehmenden MS-Patienten.....	71
Tabelle 6: Charakteristika der Kontrollpersonen.....	77

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Weißert bedanken, der mir die Arbeit an diesem interessanten Thema ermöglicht hat, und mich jederzeit in allen Fragen mit größtem Engagement unterstützte und hervorragend betreute.

Frau Dagmar Halbritter gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und Hilfe im Laboralltag und die Durchführung der HLA-Typisierung.

Herrn Dr. Josef Köstler, Frau Sylvia Allmeier und Frau Evi Lang danke ich dafür, dass ich den ELISpot-Reader so unkompliziert für die Auswertung der Versuche nutzen durfte.

Um meinen Eltern für ihre unermüdliche und großzügige Unterstützung nicht nur während der Promotion, sondern mein ganzes Leben lang zu danken, reichen sicher keine zwei Zeilen aus. Ihnen widme ich diese Arbeit. Ebenso sehr möchte ich Christian Kestler für seine liebevolle Unterstützung danken. Allen dreien danke ich auch für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Teile der Arbeit wurden 2017 unter dem Titel "Increased immune reactivity to central nervous system-derived naturally presented peptides in patients with active multiple sclerosis" im Journal of Allergy and Clinical Immunology (139:694-696.e7) veröffentlicht.

Christine Riedhammer