
Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld

**Multiple Sklerose: Systematische Analyse des T-Zell-
Repertoires von Hirnläsion, Liquor und peripherem Blut**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Christian Skulina

aus Regensburg

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. N. Goebels

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Ch. Prinz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Dezember 2003

INHALTSVERZEICHNIS

I	ZUSAMMENFASSUNG	5
II	EINLEITUNG	7
II.1	Immunologische Grundlagen	7
II.1.1	Bestandteile des Immunsystems	7
II.1.2	Toleranz und Autoimmunität	11
II.2	Multiple Sklerose	16
II.2.1	Klinik	18
II.2.2	Diagnostik und Labor	18
II.2.3	Immunpathogenese	19
II.2.4	Therapie und Prophylaxe	22
III	MATERIAL UND METHODEN	24
III.1	Isolation von Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL)	24
III.2	Selektion von Lymphozyten-Subpopulationen	24
III.3	Isolierung von Lymphozyten aus dem Liquor	25
III.4	Vorbereitung des Hirngewebes für die Gesamt-RNA-Isolation	25
III.5	Gesamt-RNA-Isolation mit TRIZOL-LS	26
III.6	Synthese der komplementären Desoxyribonucleinsäure mittels reverser Transkription	27
III.7	Identifikation klonal expandierter T-Zell Populationen durch CDR3-Spektratyping	28
III.7.1	Aufbau des T-Zell Rezeptors	28
III.7.2	BV- und BJ-Familien spezifische PCR	29
III.7.3	Fragment-analyse der PCR-Produkte	32
III.8	Sequenzierung	38
III.8.1	Subamplifikation	38
III.8.2	Probenaufreinigung	39
III.8.3	Sequenzier-Reaktion	39
III.8.4	Aufreinigung des Reaktionsansatzes	40
III.8.5	Probenauftrag	40
III.9	Verwendete Materialien	41

IV	ERGEBNISSE	43
IV.1	Kombination von CDR3-Spektratyping und Einzelzell-PCR zur Identifikation potentiell autoaggressiver T-Zellen in Hirnläsionen, Liquor und peripherem Blut	43
IV.1.1	Daten aus der PCR Analyse von T-Zellen, die aus dem Gehirn von MS-Patienten mikromanipuliert wurden.....	43
IV.1.2	CDR3 Spektratyping ist eine valide und sensitive Methode zur Identifikation und Charakterisierung expandierter T-Zellen in Gehirn, Liquor und Blut.....	44
IV.1.3	Expandierte infiltrierende T-Zell Klone von MS-Läsionen sind in Blut und Liquor nachzuweisen und persistieren dort über Jahre	45
IV.2	Vergleichende Analyse des T-Zell Repertoires von Liquor und PBL-Fraktionen durch CDR3-Spektratyping bei zusätzlichen MS-Patienten:...	56
IV.2.1	Vergleich des T-Zell Repertoires von Liquor und peripherem Blut bei Patienten mit schubförmiger Multiplen Sklerose	56
IV.2.2	Persistenz expandierter T-Zell Klone im Liquor von MS-Patienten.....	57
V	DISKUSSION	67
VI	LITERATURANGABEN	73

I ZUSAMMENFASSUNG

Die Multiple Sklerose ist eine entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems und wird zu den Autoimmunkrankheiten gezählt. Durch die Zerstörung von Myelinscheiden entstehen demyelinisierenden Läsionen in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark, die zu einer Störung der Nervenleitung führen und mit axonalem Verlust assoziiert sind. Histopathologisch sind die Läsionen durch eine dichte Infiltration mit T-Lymphozyten und Makrophagen charakterisiert. Bisher sind jedoch weder die pathogenetisch relevanten T-Zell-Klone, noch die erkannten Zielantigene identifiziert. Viele Myelin- aber auch Nicht-Myelin Antigene wurden als mögliche Ziele einer Autoimmunreaktion diskutiert (Steinman, 1996; Hafler, 1995). Auch die Interaktion der Immunzellen mit den Zellen des Zielorgans und die molekularen Effektormechanismen, mit denen die Zielstrukturen geschädigt werden, sind noch immer nicht bekannt. Die Kenntnis dieser molekularen Spieler und Mechanismen bildet zugleich die Grundlage für die zukünftige Entwicklung „spezifischer“ Therapien, die nur die pathogenetisch relevanten Komponenten des Immunsystems betreffen.

Im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, Makrophagen und Autoantikörper zur immunvermittelten Demyelinisierung beitragen können (Brosnan, 1996; Wekerle, 1994; Genain, 1999).

Autoreaktive T-Lymphozyten gehören zum normalen Immunrepertoire des Menschen, sind per se also nicht krankheitsspezifisch. Bei Autoimmunerkrankungen entkommen diese autoreaktiven Lymphozyten durch unbekannte Mechanismen der Kontrolle des Immunsystems, werden aktiviert und proliferieren. In diesem aktivierten und (oligo-) klonal expandierten Zustand können sie dann das Organ, für das sie spezifisch sind, schädigen.

Für die Identifikation expandierter Lymphozytenklone wurde mit dem CDR3-Spektratyping eine neuere, PCR-gestützte molekulargenetischen Nachweismethode etabliert, durch die es möglich ist, expandierte T-Zell-Klone in verschiedenen Kompartimenten systematisch zu erfassen und Sequenzinformationen über die Zusammensetzung der dritten hypervariablen Region (CDR3) der expandierten Zellklone zu ermitteln.

Es bot sich uns die günstige Gelegenheit, mit Hilfe des CDR3-Spektratypings das T-Zell Repertoire von MS-Läsionen des Gehirns, des Liquors und verschiedener Subfraktionen des peripheren Blutes zweier noch lebender MS Patienten systematisch zu untersuchen.

Im Falle von Patient F.E. konnten wir die mit dieser Methodik erhaltenen Sequenzen der CDR3-Region mit Sequenzen vergleichen, die von Babbe et al. auf Einzelzellebene bei dem selben Patienten identifiziert wurden; mittels hydraulischer Mikromanipulation wurden einzelne Zellen direkt aus der Hirnläsion (parenchymal) bzw. aus perivaskulärem Hirngewebe isoliert, und die CDR3 Region des T-Zell-Rezeptors durch Einzelzell-PCR amplifiziert und sequenziert (Babbe et al., 2000). Mit CDR3-Spektratyping konnten wir mit einer Ausnahme alle auf Einzelzellebene identifizierten expandierten T-Zell-Klone im Gehirn bestätigen. Dadurch schlossen wir aus, dass es sich bei den von uns identifizierte T-Zell-Klonen um eine bloße Kontamination mit Blut-Lymphozyten handelte. Zusätzlich identifizierten wir Sequenzen, die nicht mittels Einzelzellanalyse gefunden wurden. 5 Jahre später waren die meisten dieser das Gehirn infiltrierenden T-Zell-Klone im Liquor, in der CD8+ und/oder der CD38+ Subpopulation des peripheren Blutes expandiert detektierbar. Keiner fand sich unter den CD4+ Blutzellen.

Wir haben erstmals gezeigt, dass bei der Multiplen Sklerose potentiell krankheitsrelevante, expandierte CD8+ T-Zell-Klone nicht nur im Hirngewebe, sondern auch im Blut und Liquor zu finden sind und über mehrere Jahre persistieren. Dieses Erkenntnis könnte für die zukünftige MS-Forschung eine große Bedeutung haben, da krankheitsrelevante Zellen in einem peripheren Kompartiment (Blut, Liquor) erheblich leichter experimentellen Zwecken zugänglich sind.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass insbesondere aktivierte T-Lymphozyten die Fähigkeit besitzen, vom peripheren Blut in den Liquor zu wandern und dort über Jahre zu persistieren.

II EINLEITUNG

II.1 Grundlagen des Immunsystems

II.1.1 BESTANDTEILE DES IMMUNSYSTEMS

Die zellulären Hauptbestandteile des Immunsystems bilden die B- und T-Lymphozyten, die Antigen-spezifische Immunreaktionen ausüben können, und die Monozyten und polymorphnukleäre Leukozyten, die Fremdstoffe und Pathogene mit Antigen-unabhängigen Mechanismen entfernen können. Auf ihrer Oberfläche tragen B- und T-Zellen Antigen-spezifische Rezeptoren, Immunglobuline (Ig) im Falle der B-Zellen und T-Zell-Rezeptoren (TCR) bei T-Zellen. Das Immunrepertoire von B- und T-Zellen, d.h. die Anzahl spezifisch erkennender Immunrezeptoren, wird auf mindestens 10^{14} - 10^{15} geschätzt (Janeway & Travers, 1994). Von jeder B- oder T-Zelle jeweils nur ein einziger Typ von Antigen-spezifischen Rezeptoren, dieser jedoch in tausendfacher Kopie exprimiert. Die Fragen, wie das Immunsystem mit einer begrenzten Anzahl von Genen (geschätzt für das menschliche Genom etwa 10^5) diese fast unvorstellbar große Anzahl spezifischer Immunrezeptoren generieren kann, wurde erst Anfang der 80'er Jahre durch Tonegawa (Tonegawa, 1983) und Davis (Davis & Bjorkman, 1988) geklärt. Der Schlüssel hierfür liegt in dem Prozeß der „somatischen Rekombination“, einem Mechanismus, der dem eines Zahlenschlosses ähnelt (Abb. 1 oben). Die Gene für Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren werden als Sets von Gensegmenten vererbt. Jedes Set kodiert für einen anderen Teil des Immunrezeptors und enthält zahlreiche Möglichkeiten, diese jeweilige Position im Immunrezeptor zu besetzen. Während der Differenzierung von B-Zellen im Knochenmark und von T-Zellen im Thymus wird nach dem Zufallsprinzip aus jedem der Sets jeweils ein Segment zufällig ausgewählt und zu einer einzigartigen Genkombination zusammengefügt, die dann die Antigen-spezifität aller Immunrezeptoren der jeweiligen Zelle festlegt und kodiert (Abb. 1 unten). Durch diesen Mechanismus kann mit einer begrenzten Anzahl von Immunrezeptorgenen eine praktisch unbegrenzte Anzahl von verschiedenen Immunrezeptoren generiert werden.

Wenn nun das Immunsystem mit einem invadierenden Pathogen konfrontiert wird, werden diejenigen B- und T-Zell-Klone, die zufällig Rezeptoren tragen, die diese Pathogene spezifisch erkennen, aktiviert und proliferieren (Abb. 2).

Die Zellklone, die das Pathogen am besten erkennen, werden am stärksten stimuliert. Durch diesen Prozess der „klonalen Selektion“ von einem großen Pool vorbestehender Immunzellen kann die beeindruckende Adaptationsfähigkeit des Immunsystems erklärt werden. Bei einer zweiten Begegnung mit demselben Pathogen sorgen langlebige „Gedächtniszellen“ für eine schnelle und effiziente Eliminierung des Pathogens. Diese „Gedächtniszellen“ sind die Basis für eine langandauernde Immunität nach Infektionen und Impfungen.

B- und T-Zellen arbeiten bei den meisten Immunreaktionen eng zusammen. Mit Hilfe des Ig-Rezeptors können B-Zellen Antigene aufnehmen, prozessieren und auf ihrer Oberfläche exprimieren, die dann von den Antigen-spezifischen Rezeptoren der T-Helfer-Zellen erkannt werden können. Durch diese Interaktion kommt es zur Proliferation und weiteren genetischen Modifikationen der B-Zelle. Eine dieser Modifikationen ist das sogenannte „Isotyp-Switching“, bei dem die Isotyp-Klasse (IgM, IgG, IgD, IgA, IgE) der Antikörper, die von einer B-Zelle produziert werden, geändert wird. Jede der verschiedenen Isotyp-Klassen hat eine eigene konstante Region. Durch eine erneute genetische Rekombination der konstanten Gensegmente kann eine Änderung der Isotyp-Klasse erfolgen. Dadurch wird zwar die Antigen-Spezifität der Immunglobuline nicht verändert, wohl aber deren funktionellen Eigenschaften wie Serumhalbwertszeit, Komplementaktivierung und Bindungsaffinität an verschiedene Typen von Fc-Rezeptoren.

Die andere Art der genetischen Modifikation ist die somatische Hypermutation. Hierbei handelt es sich um zufällige Deletionen, somatische Punktmutationen und Insertionen in den variablen Gensegmenten rasch teilender B-Zellen. Nur diejenigen B-Zellen, die besonders hochaffine Rezeptoren exprimieren, überleben und entwickeln sich letztlich zu Antikörper-sezernierenden Plasma- oder Gedächtniszellen.

Durch diesen Mutations- und Auswahlprozeß im Rahmen der somatischen Hypermutation wird die Bindungsaffinität der jeweiligen Antikörper („Affinitätsreifung“) erhöht.

Die Rezeptoren von B- und T-Zellen erkennen Antigene auf völlig unterschiedliche Art und Weise. B-Zellen und Antikörper binden Pathogene im Extrazellulärraum. Antikörper neutralisieren das Pathogen, das dann von Phagozyten aufgenommen werden kann, und aktivieren das Komplementsystem.

T-Zellen erkennen keine löslichen Antigene, sondern nur kurze Peptidbausteine prozessierter Antigene, die im Zusammenhang mit körpereigenem MHC („Major

histocompatibility complex“) von einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) präsentiert werden („MHC-restringierte Antigenerkennung“). Zwei Klassen von MHC-Molekülen werden unterschieden (Abb. 3): MHC-Klasse-I-Antigene, die humanen Leukozyten Antigene (HLA) -A, -B, und -C umfassen; zu den MHC-Klasse-II-Antigenen gehören HLA-DR, -DP und -DQ. Es gibt gewisse Unterschiede zwischen beiden Klassen von MHC-Molekülen bezüglich Struktur und Funktion. CD4+ („Helfer“) T-Lymphozyten erkennen ihre Antigene im Kontext mit MHC-Klasse-II-Molekülen, während CD8+ („zytotoxische“) T-Lymphozyten (CTL) Antigene erkennen können, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden.

Auf MHC-Molekülen werden Peptide unterschiedlicher Quellen präsentiert: MHC-Klasse-I-Moleküle binden Peptide von Pathogenen, die sich im Zytosol infizierter Zellen vermehren, wie z.B. bestimmte Bakterien und Viren. Diese Erreger können nur eliminiert werden, wenn die sie enthaltende (Antigen-präsentierende) Zelle ebenfalls zerstört wird.

Da MHC-Klasse-I-Moleküle auf fast allen Zellen des Körpers exprimiert werden, kann jede infizierte Zelle auf diese Art eliminiert werden. Auf den MHC-Klasse-I-Molekülen nichtinfizierter Zellen werden üblicherweise „Selbstpeptide“ von endogenen Proteinen präsentiert, die vom Immunsystem als „körpereigen“ erkannt und ignoriert werden. MHC-Klasse-II-Antigene werden überwiegend auf Immunzellen wie B-Zellen, aktivierten T-Zellen und Makrophagen exprimiert. MHC-Klasse-II-Moleküle binden Peptide von Proteinen, die in intrazellulären Vesikeln degradiert werden. Diese Peptide stammen von intrazellulären Bakterien oder von exogenen Antigenen, die durch Phago- oder Endozytose in die Zelle aufgenommen werden.

Für die Aktivierung einer T-Zelle sind neben der Erkennung eines an ein MHC-Molekül gebundenen Fremdpeptids zusätzliche kostimulierende Signale von der jeweils Antigen-präsentierenden Zelle erforderlich. Zu den sogenannten „professionellen“ Antigen-präsentierenden Zellen gehören B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen. Ein wichtiges kostimulierendes Molekül ist beispielsweise das von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen exprimierte Molekül B7, das mit dem Molekül CD28 auf T-Lymphozyten interagiert. Ohne den zusätzlichen Einfluß kostimulatorischer Moleküle werden T-Lymphozyten nicht aktiviert, sondern im Gegenteil inaktiviert („anergisch“) (Schwartz, 1996). Durch diese doppelte Erfordernis sowohl nach spezifischer Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit Peptid/MHC-Komplex als auch nach

Kostimulation wird verhindert, dass naive T-Zellen mit Antigenen reagieren, die auf Gewebszellen ohne kostimulierende Eigenschaften präsentiert werden.

Nach Bindung der jeweiligen Liganden wird die intrazelluläre Signaltransduktion durch den TCR-CD3-Komplex oder durch CD28 und CTLA-4 vermittelt, was zur Bildung von sekundären Botenstoffen („second messenger“) führt.

Der Botenstoff Diacylglycerol bewirkt beispielsweise eine Aktivierung der intrazellulären Proteinkinase C, was wiederum zu einer komplexen Kaskade von weiteren Signalübertragungsereignissen führt, Inositoltriphosphat bewirkt eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums. Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumionen-konzentration und die Aktivierung der Proteinkinase C sind häufige Merkmale der Stimulation von Zellproliferation. Die Kombination dieser Signale aktiviert DNA-bindende Proteine und Transkriptionsfaktoren und führt zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen (Hohlfeld, 1997).

II.1.2 TOLERANZ UND AUTOIMMUNITÄT

Durch den Mechanismus der somatischen Rekombination entsteht auch eine große Anzahl von T-Zell-Rezeptoren, die entweder nutzlos sind, da sie körpereigenes MHC nicht erkennen, oder gefährlich, da sie körpereigene Antigene im Kontext mit dem körpereigenen MHC erkennen. Die Selektion dieser „unerwünschten“ T-Zellen erfolgt im Thymus. Als Erstes lernen T-Zell-Vorläufer, MHC-Moleküle als Antigen-präsentierende Instanz zu erkennen („positive Selektion“). Daraufhin müssen sie lernen, körpereigene Antigene zu tolerieren, die auf diesen MHC-Molekülen präsentiert werden, was zumindest zum Teil dadurch geschieht, dass T-Zellen, die körpereigene Peptide auf MHC-Molekülen des Thymus erkennen, eliminiert werden. Etwa 98% der täglich generierten Thymozyten sterben im Thymus durch programmierten Zelltod (Apoptose). Nur die wenigen T-Zellen, die diese Auswahlprozesse überleben, verlassen den Thymus als reife T-Zelle. Dieser Prozess der Elimination autoreaktiver T-Zellen bildet einen Hauptmechanismus zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen; es wird jedoch zunehmend klarer, dass auch das normale Immunsystem viele T-Zellen enthält, die im Thymus exprimierte Autoantigene erkennen (Wekerle et al., 1996). Es werden im Thymus tatsächlich auch viele Proteine exprimiert, von denen man lange glaubte, dass sie nur in peripheren Geweben vorkommen. Dies gilt auch für enzephalitogene Antigene, wie z.B. S100 oder basisches Myelinprotein (MBP) (Wekerle et al., 1996). T-Zellen, die diese Antigene erkennen, kommen auch im Immunsystem Gesunder vor. Dies lässt den Schluss zu, dass die Elimination autoreaktiver T-Zellen im Thymus unvollständig ist. Ein bestimmtes Maß an Autoimmunität ist physiologisch und wichtig für die normale Immunfunktion (Dighiero et al., 1999).

Durch „periphere Toleranz“ wird verhindert, dass autoreaktive T-Zellen, die nicht im Thymus eliminiert wurden, körpereigenes Gewebe schädigen. Es kommt zur sogenannten „klonale Inaktivierung“, wenn autoreaktive T-Zellen ihr Antigen zwar im Kontext mit körpereigenem MHC erkennen, aber keine zusätzlichen kostimulatorischen Signale erhalten (Schwartz, 1996). So fehlt z.B. den meisten Gewebszellen das wichtige kostimulierende Molekül B7. Auf diese Art und Weise könnten periphere Gewebe mit dazu beitragen, dass autoreaktive T-Zellen, die die Thymuskontrolle überwunden haben, in der Peripherie inaktiviert werden. Die aktive Suppression autoreaktiver T-Zellen

durch „Suppressor-T-Zellen“ einen weiteren, noch wenig verstandenen Mechanismus der peripheren Toleranz dar. Toleranz von B-Zellen wird durch ähnliche Mechanismen bewirkt (Hodgkin & Basten, 1995).

Versagen die beschriebenen Mechanismen der immunologischen Toleranz, können Autoimmunerkrankungen entstehen. Eine Autoimmunerkrankung ist als klinisches Syndrom definiert, das verursacht ist durch die Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen oder beiden in Abwesenheit einer gerade ablaufenden Infektion oder anderer erkennbarer Ursachen. Die genauen Faktoren, die den Autoimmunprozess auslösen, sind meist nicht bekannt. Es wird angenommen, dass bestimmte Infektionen z.B. durch Veränderung der Antigenität des infizierten Gewebes bei genetisch empfänglichen Individuen Autoimmunprozesse auslösen können. Durch eine Infektion können Gene, die normalerweise nicht transkribiert werden, „angeschaltet“ werden oder normale Genprodukte werden durch eine Änderung der posttranskriptionellen Prozessierung als Autoantigen wirksam. Auch können kostimulatorische Faktoren, die auf normalem Gewebe nicht vorhanden sind, durch einen Entzündungsprozess induziert werden und so zu einer Stimulation autoaggressiver T-Zellen beitragen. Auch kann es zur Kreuzreaktion von T- und B-Zellen zwischen infektiösem Erreger und Autoantigen kommen, man als „molekulares Mimikry“ bezeichnet. Bei der Multiplen Sklerose gibt T-Zellen, die sowohl mit einem Peptid des Autoantigens Myelin-Basisches-Protein (MBP) als auch mit Peptiden des Epstein-Barr Virus, des Influenzavirus und des humanen Papillomavirus reagieren können (Wucherpfennig et al., 1995). Bei den meisten Autoimmunerkrankungen ist es bislang nicht gelungen, krankheitsauslösende Infektionen zu identifizieren, da der langsame Beginn der meisten Autoimmunerkrankungen, den genauen Krankheitsbeginn verschleiert. Sobald der Autoimmunprozeß einmal in Gang gekommen ist, ist die weitere Anwesenheit des Infektionserregers wahrscheinlich nicht mehr notwendig, (Hohlfeld, 1997).

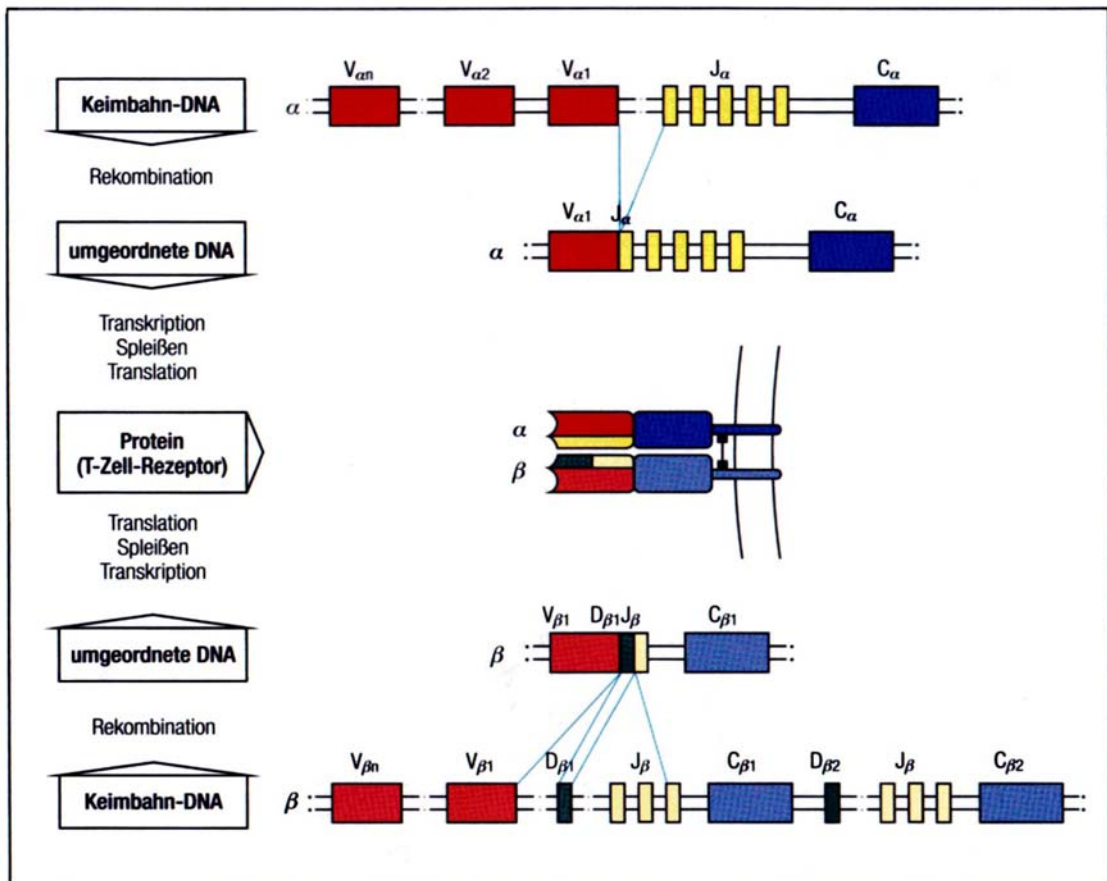
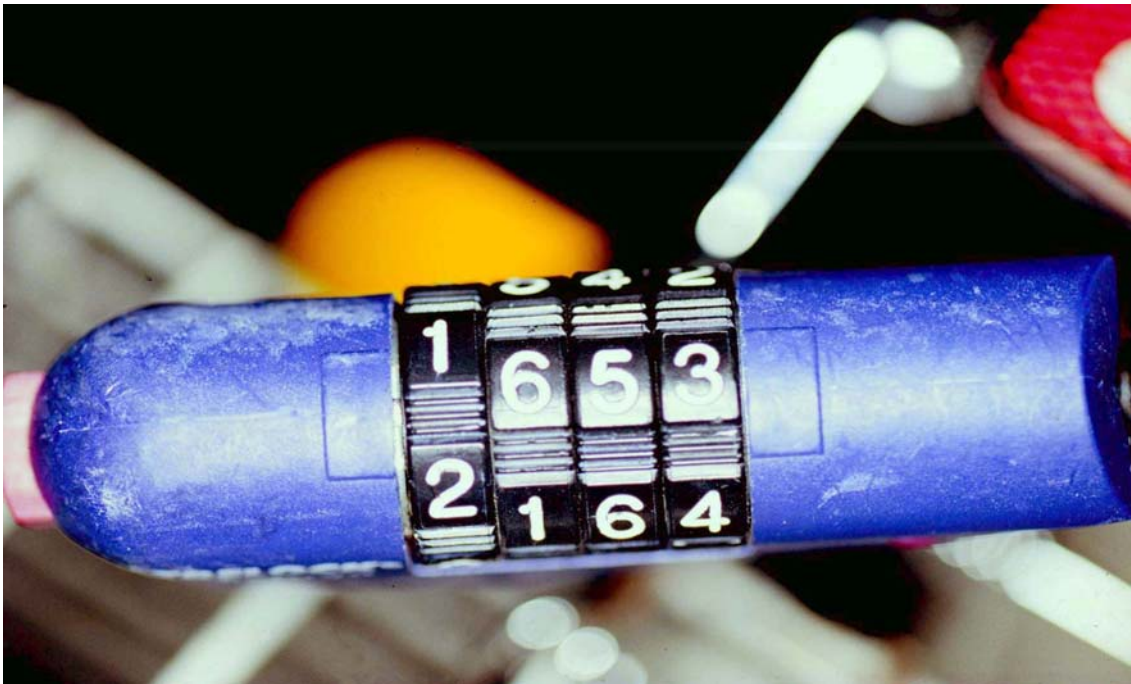


Abbildung 1: Analogie der somatischen Rekombination der CDR3-Region, hier am Beispiel des T-Zell-Rezeptors, mit der zufälligen Generation von Zahlen-Kombinationen bei einem Zahlenschloss (untere Abbildung aus Janeway und Travers, 1994).

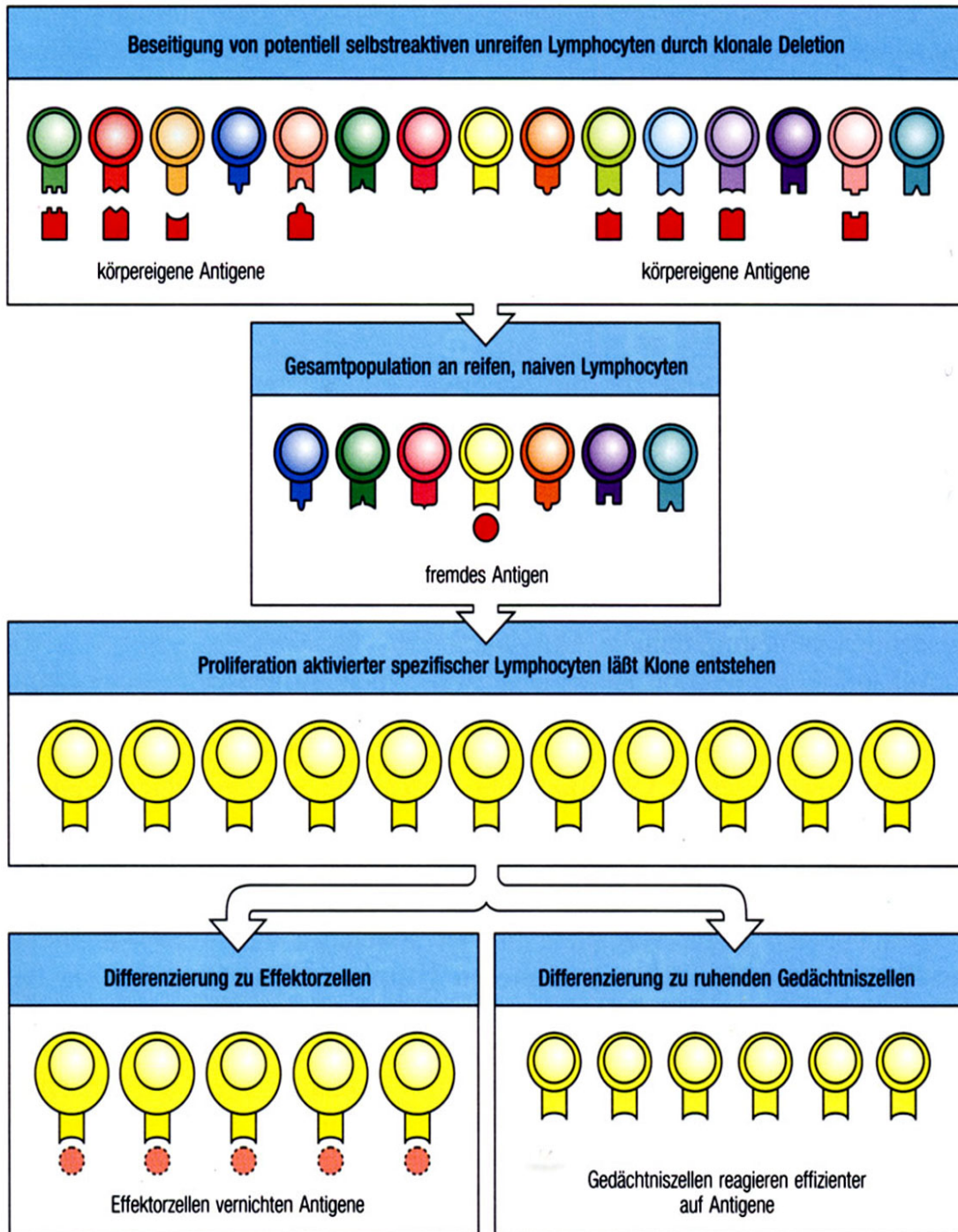
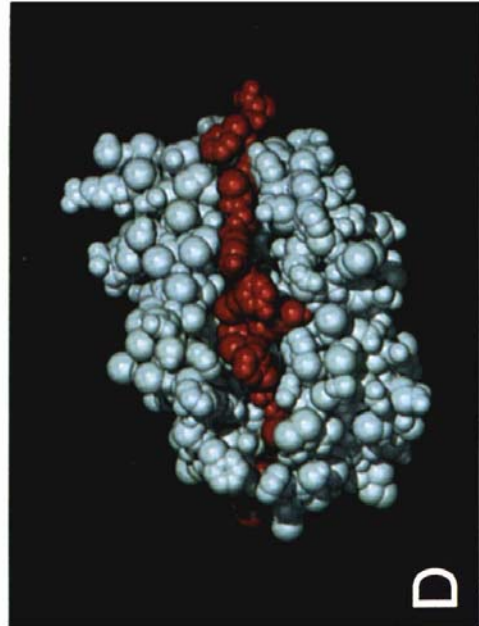
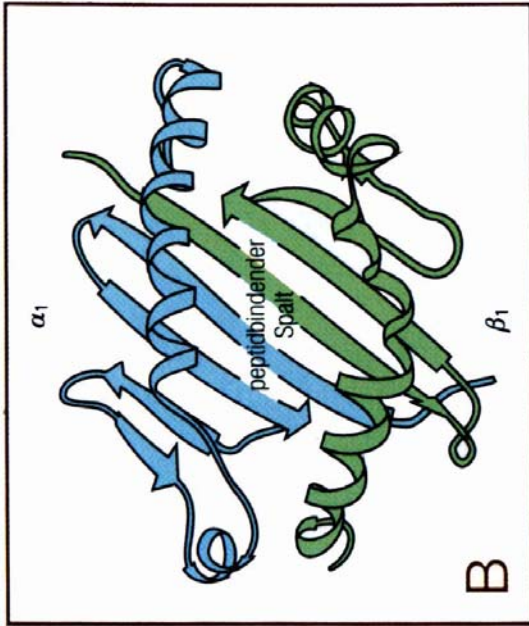
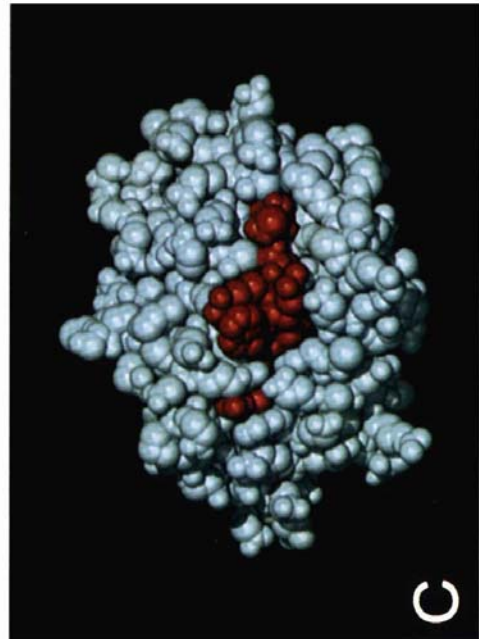
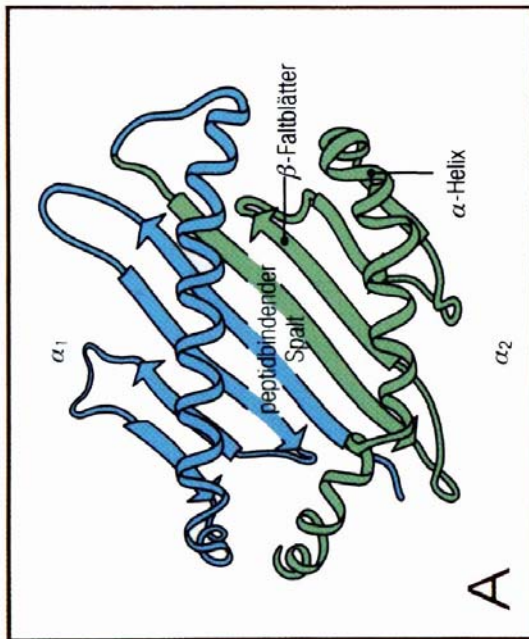


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Deletion autoreaktiver Lymphozytenklone und der klonalen Expansion von Lymphocyten nach Exposition mit einem spezifischen Fremdantigen (aus Janeway und Travers, 1994).

MHC-Klasse II



MHC-Klasse I



ohne Peptid

mit Peptid

Abbildung 3: MHC Moleküle. A, B: schematische Darstellung der β -Faltblattstruktur. C,D: 3D-Modell mit präsentiertem Peptid (aus Janeway & Travers, 1994).

II.2 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose stellt die häufigste neuroimmunologische Erkrankung und die häufigste entzündliche ZNS Erkrankung dar. Allein in Deutschland sind etwa 120.000 Menschen (d.h. rund 0,15 % der Bevölkerung) von dieser Krankheit betroffen. Die für die MS typischen Läsionen werden als „Entmarkungsherde“ (Plaques) bezeichnet. Sie sind histologisch durch die Zerstörung der Markscheiden von Nervenfasern des Zentralnervensystems charakterisiert. Die Entmarkungsherde finden sich bevorzugt in der weißen Substanz des Zentralnervensystems. Große Entmarkungsherde sind bereits makroskopisch erkennbar (Abb. 4). Der Bereich aktiver Demyelinisierung befindet sich am Rand des Plaques. Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen wandern während eines frühen Stadiums aus kleinen Blutgefäßen in die umgebende weiße Hirnsubstanz aus (Abb. 4) und spielen eine entscheidende Rolle bei der Zerstörung des Myelins. Auch die Axone der Nervenfasern werden wahrscheinlich bereits in frühen Krankheitsstadien geschädigt (Trapp et al., 1998). In den Randgebieten der Entmarkungsherde finden sich Axonabschnitte mit sehr dünnen Markscheiden, wahrscheinlich als Ausdruck von Remyelinisierung. Wie immunzytochemische Untersuchungen gezeigt haben, enthalten die Entmarkungsherde sowohl CD8+ (zytotoxische/Suppressor-) T-Lymphozyten als auch CD4+ (Helfer-) T-Lymphozyten. Der relative Anteil der verschiedenen Effektormechanismen (T-Zellen, Makrophagen, Antikörper) an der Zerstörung der Myelinscheiden ist noch ungeklärt. In der Kernspintomographie stellen sich Entmarkungsherde nicht-invasiv als T2-hyperintense Läsionen dar, wobei die mit der Kernspintomographie sichtbare Läsionsaktivität häufig deutlich größer ist als die an klinischen Symptomen erkennbare Krankheitsaktivität. Wahrscheinlich sind viele Entzündungsherde in klinisch „stummen“ Arealen lokalisiert.

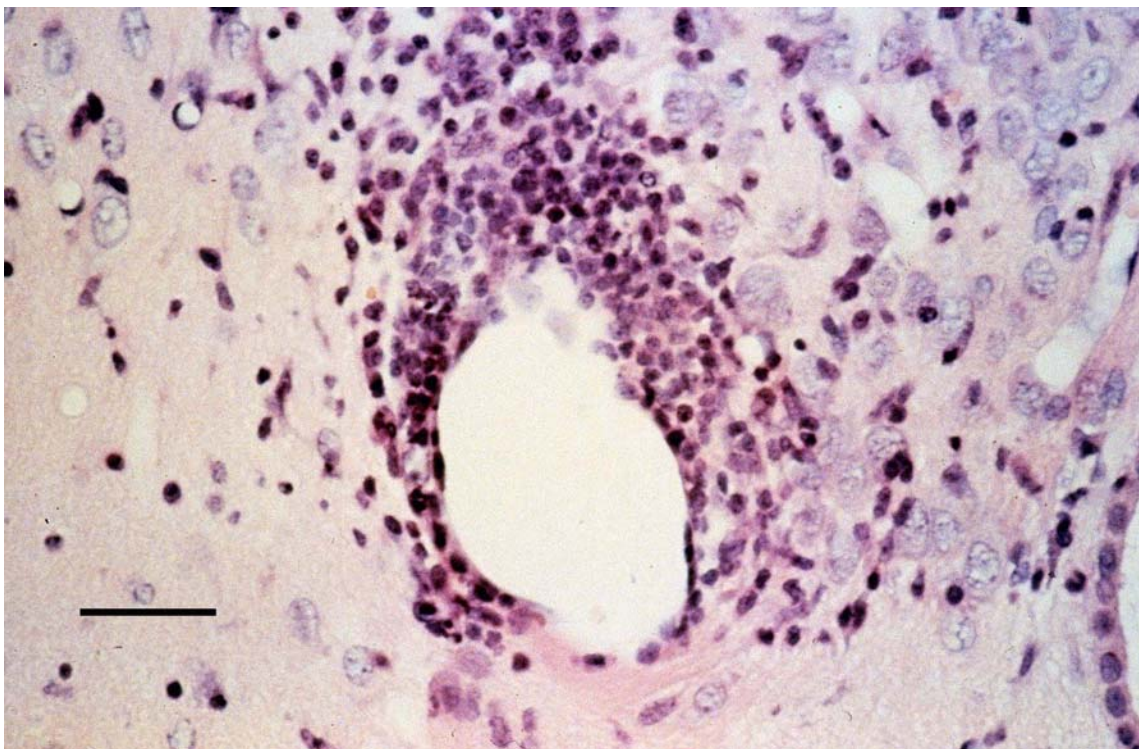
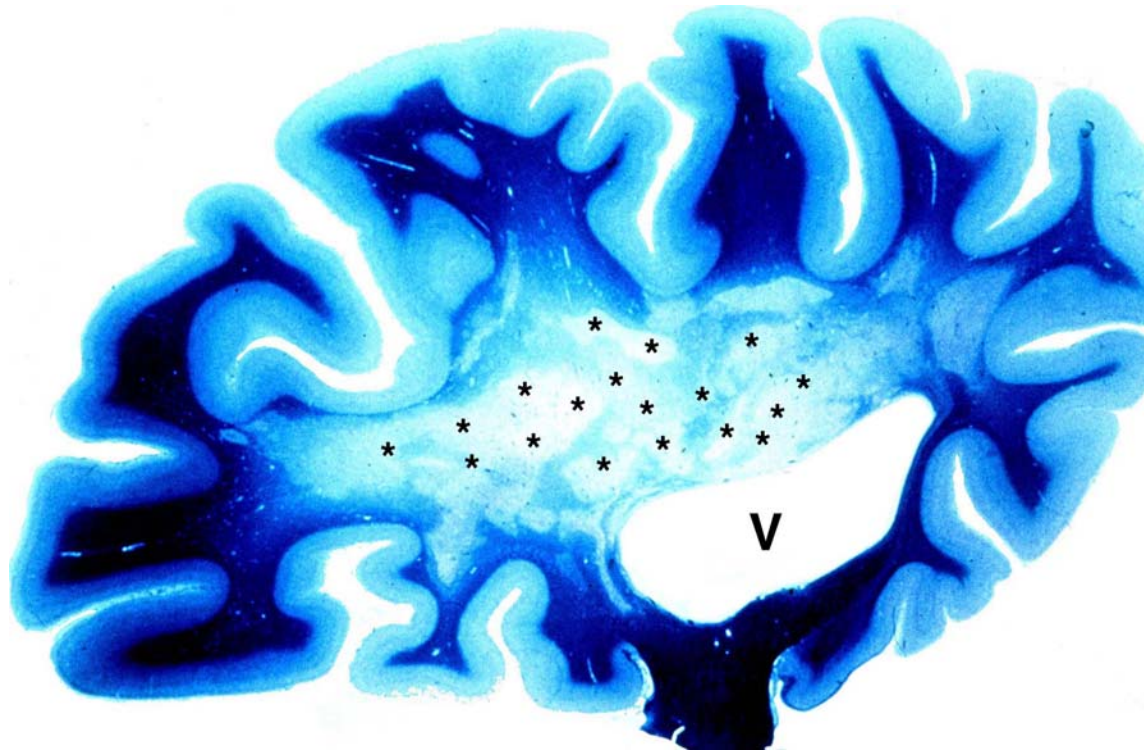


Abbildung 4: Oben: Myelinfärbung eines Sagittalschnittes durch ein MS-Gehirn. Blau=Myelin, V=Ventrikel, * = Demyelinisierung. Unten: Perivenöses Infiltrat (Maßstab=50 μ m).

II.2.1 KLINIK

Das typische Erkrankungsalter liegt zwischen dem 15. und 50. Lebensjahre, Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer. Inzidenz und Prävalenz sind in Äquatornähe deutlich geringer als in nördlichen oder südlichen Breiten. Es besteht eine Assoziation mit HLA-Antigenen (HLA-A3, B7, DR2, Dw2). Die Multiple Sklerose ist damit zwar keine „Erbkrankheit“, aber Geschwister von Betroffenen erkranken durchschnittlich 20x und Kinder von Betroffenen 12x häufiger als der Bevölkerungsdurchschnitt. Die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen beträgt ca. 30%.

Der Krankheitsverlauf ist bei den meisten Patienten zu Beginn der Erkrankung schubförmig („relapsing remitting MS“; RRMS). Bei etwa 10 % der Patienten verläuft die Krankheit von Beginn an chronisch-progredient („primary progressive MS“; PPMS). Ein solcher primär chronisch-progredienter Verlauf findet sich besonders bei Patienten mit Krankheitsbeginn jenseits des 45. Lebensjahres. Primär schubförmige Erkrankungen gehen nach 10-20 jährigem Krankheitsverlauf in vielen Fällen in einen sekundär chronisch-progredienten Verlauf über („secondary progressive MS“; SPMS). 10 Jahre nach Erkrankungsbeginn können etwa ein Viertel der Patienten ein nahezu uneingeschränktes berufliches und soziales Leben führen. Je nach Lokalisation der Läsionen kann bei der Multiplen Sklerosen eine Vielzahl klinischer Symptome auftreten; einige aber sind für die Erkrankung relativ typisch. Die Erstsymptome sind in abnehmender Häufigkeit: Gangstörungen und Paresen der Beine, Störungen der Sensibilität (häufig in Begleitung unangenehmer Missempfindungen), einseitiger Visusverlust bei Optikus-Neuritis, Paresen und Koordinationsstörungen der Arme, Störungen der Sphinkterfunktion von Blase und Mastdarm, Schwindel. Auch ein Kleinhirnsyndrom mit Ataxie und Augenbewegungsstörungen ist charakteristisch.

II.2.2 DIAGNOSTIK UND LABOR

Die Diagnose der Multiplen Sklerose ist bis heute eine Ausschlussdiagnose, es gibt keinen spezifischen Labortest. Dennoch hat eine Reihe technischer Zusatzuntersuchungen eine entscheidende Bedeutung für die Diagnostik erlangt. Dies sind insbesondere die cranielle Kernspintomographie, die elektrophysiologische Messung der visuellen und somatosensiblen evozierten Potentiale, sowie die Immundiagnostik des Liquor cerebrospinalis. Allerdings ist keine einzige der bei der

MS beschriebenen Liquorveränderungen krankheitsspezifisch. Bei etwa einem Viertel der Patienten ist die Gesamtproteinkonzentration im Liquor leicht über den Normalwert von etwa 45 mg/100 ml erhöht; auch die Liquorzellzahl ist oft geringfügig erhöht, in der Regel aber nicht über 20 Zellen/ μ l. Es handelt sich dabei vorwiegend um CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten und vereinzelte Plasmazellen. Die für die Multiple Sklerose typische, jedoch nicht spezifische intrathekale (d.h. im Liquorkompartiment stattfindende) Immunglobulin (Ig) -Synthese wurde bereits 1942 beschrieben (Kabat et al., 1942). Lowenthal entdeckte Hinweise für die Oligoklonalität des Liquor-IgG bei der MS (Lowenthal et al., 1960), aber erst die systematischen Untersuchungen von Laterre zeigten die Bedeutung dieses Phänomens auf breiterer Basis (Laterre et al., 1970). Liquorspezifische oligoklonale Immunglobulinbanden (OKB) sind elektrophoretisch im Liquor von >95 % der MS-Patienten nachweisbar (Tourtellotte et al., 1984) und sind damit das häufigste und konstanteste immunologische Phänomen. Oligoklonale Immunglobulinbanden stellen das Korrelat der Immunantwort (oligo-)klonal expandierter Plasmazellen im Liquor von Patienten mit MS dar. Mit Hilfe zweidimensionaler Gelelektrophorese wurde die weitgehende Konstanz individueller Ig-Bandenmuster über Jahre hinweg demonstriert, die auch unter immunsuppressiver Therapie -in abgeschwächter Ausprägung- persistieren (Walsh & Tourtellotte, 1986). Da kein einziger der immunologischen oder sonstigen Zusatzbefunde spezifisch ist für die MS, muss differentialdiagnostisch eine große Anzahl entzündlicher, vaskulärer, metabolischer und anderer ZNS-Erkrankungen berücksichtigt werden.

II.2.3 IMMUNPATHOGENESE

Die Ätiologie der Multiplen Sklerose ist bislang ungeklärt. Sowohl äußere als auch genetische Faktoren spielen eine Rolle (Martin et al., 1992; Steinman, 1996b; Noseworthy, 1999). Die verschiedene klinische Subtypen und unterschiedlichen histologischen Muster deuten auf eine heterogene Pathogenese der MS hin (Lucchinetti et al., 1996). Wie in Tiermodellen der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) gezeigt wurde, können T-Lymphozyten, Makrophagen und Autoantikörper zur immunmedierten Myelin-Schädigung beitragen (Wekerle et al., 1994; Brosnan &

Raine, 1996; Genain et al., 1999). Die tatsächlich krankheitsauslösenden Effektormechanismen der MS sind jedoch noch ungeklärt. Verschiedene Myelin- und nicht-Myelin-Antigene wurden als mögliche Zielantigene einer Autoimmunreaktion diskutiert (Hafler & Weiner, 1995; Steinman, 1996b; Wekerle, 1998). Trotz der Analogien zum Tiermodell der EAE ist nicht gesichert ob und in welchem Umfang die Immunantwort gegen im ZNS exprimierte Autoantigene in der Pathogenese der MS eine Rolle spielt.

Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen können an einer pathogenen Immunantwort gegen ZNS-Autoantigene mit Schädigung von Oligodendrozyten durch direkte Zytolyse oder Sekretion von Zytokinen beteiligt sein. Das pathogene Potential von Myelin-spezifischen CD4⁺ T-Zellen konnte in den verschiedenen EAE-Tiermodellen gut dokumentiert werden (Lassmann et al., 1991; Wekerle et al., 1994). So ist die erhöhte Frequenzen aktivierter Myelin-reaktiver T-Zellen im Liquor von MS-Patienten hinweisend für eine pathogene Rolle von CD4⁺ T-Zellen (Chou et al., 1992; Zhang et al., 1994). Auch die Assoziation von MS mit bestimmten MHC-Klasse-II- Haplotypen deutet daraufhin, dass die Präsentation von Antigenen zu CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielt (Steinman, 1996b; Noseworthy, 1999).

Auch für eine bedeutende Rolle von CD8⁺ T-Zellen bei der entzündlichen Myelinzerstörung gibt es Hinweise. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen zur entzündlichen Myelinzerstörung beitragen (Koh et al., 1992; Murray et al., 1998). Bereits eine frühe Studie zeigte die Überexpression bestimmter T-Zell-Rezeptor (TCR) Gene in MS Läsionen im Gehirn (Oksenberg et al., 1990). Myelin-spezifische zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (CTL) konnten im Blut von MS-Patienten aber auch gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden (Tsuchida et al., 1995; Jurewicz et al., 1998). Da humane Oligodendrozyten in vitro MHC-Klasse-I-Antigene exprimieren können (Grenier et al., 1989; Massa et al., 1993), sind sie mögliche Ziele einer Lyse durch MBP-spezifische CTL (Jurewicz et al., 1998). Proteolipidprotein- (PLP) spezifische CTL können proinflammatorische Zytokine sezernieren (Biddison et al., 1997) und dadurch CD4⁺ Myelin-spezifische T-Zellen anlocken (Biddison et al., 1998). Durch die Analyse von Einzelzellen, die durch hydraulische Mikromanipulation aus aktiven MS-Läsionen gewonnen wurden, konnte erst kürzlich eine extensive klonale Expansion von hauptsächlich CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen (Babbe et al., 2000) werden. Eine andere Studie wies ebenfalls auf Einzelzell-Ebene die klonale Expansion

von CD8⁺ T-Zellen im Liquor von MS-Patienten nach (Jacobson et al., 2002) Diese klonalen Expansionen fanden sich in beiden Studien vorwiegend in der CD8⁺ und nur in weitaus geringerem Ausmaß in der CD4⁺ Subpopulation. Auch in der vorliegenden Dissertation konnte bestätigt werden, dass sich in MS-Läsionen die CD8⁺ T-Zellen, im Gegensatz zu der wesentlich heterogeneren Population der CD4⁺ T-Zellen, aus einer oligoklonalen Population zusammensetzen (siehe auch Babbe et al., 2000) . Viele dieser CD8⁺ T-Zell-Klone des Gehirns persistierten über bis zu 5 Jahre im Liquor und peripherem Blut und waren dort z.T auch im CD38⁺ (aktivierten) Kompartiment nachweisbar. Zusätzliche Aspekte lieferte eine kürzlich erschienene Arbeit über die Rolle der CD8⁺ T-Zellen bei der MS und der EAE. Der frühe Verlust von Oligodendrozyten und Neuronen konnte nur schwer mit einem Konzept erklärt werden, das die CD4⁺ T-Helfer Zellen im Mittelpunkt sah, da Oligodendrozyten und Neurone nur MHC-Klasse I Moleküle exprimieren und somit Antigen nicht für CD4⁺ T-Zellen präsentieren können (Redwine et al., 2001). Eine andere Studie zeigte, dass CD8⁺ T-Zellen Axone auf eine antigen-spezifische Art und Weise attackieren, was zu axonaler Schädigung führt, wie sie in MS-Hirnläsionen zu finden ist (Medana et al., 2001). Auch wurde nachgewiesen, dass CD8⁺ T-Zellen für Oligodendrozyten und Neurone zytotoxisch sein können (Jurewicz et al., 1998; Medana et al., 2000).

Neben pathogenen autoreaktiven T-Zellen können MS-Läsionen auch T-Zellen enthalten, die der Gewebszerstörung entgegenwirken (Kerschensteiner et al., 1999). Bei der EAE wurden sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften beschrieben (Sun et al., 1988; Jiang et al., 1992; Koh et al., 1992; Van de Keere & Tonegawa, 1998; Olivares-Villagómez et al., 1998).

Zunehmend finden sich auch Hinweise für die Beteiligung von Immunglobulinen bei der Formierung demyelinisierender Läsionen bei der MS. So wurde beispielsweise in den MS-Plaques an Oligodendrozyten oder an Makrophagen gebundenes IgG, Komplement (Prineas & Graham, 1981; Compston et al., 1989) und terminale Komplementkomplexe (Storch et al., 1998) nachgewiesen, was auf deren Beteiligung an der Immuneffektorphase der Demyelinisierung hinweist. Bei der EAE wurde die Relevanz von B-Lymphozyten demonstriert (Übersichten bei (Wekerle et al., 1994; Bradl & Linington, 1996)). Im Ratten- und Primatenmodell der EAE führt der Transfer von Myelin-spezifischen T-Lymphozyten allein zwar zu einer Entzündungsreaktion im ZNS, zu einer ausgeprägten Demyelinisierung kommt es jedoch erst durch die zusätzliche Einwirkung von Myelin-spezifischen Antikörpern

(Linington & Lassmann, 1987; Linington et al., 1988; Genain et al., 1995). Die Rolle von Myelin-spezifischen Antikörpern und Komplement bei der Schädigung der Myelinproduzierenden Oligodendrozyten wurde in vitro von mehreren Arbeitsgruppen demonstriert (Kim et al., 1970; Honegger et al., 1989; Scolding et al., 1989).

II.2.4 THERAPIE UND PROPHYLAXE

Da die Pathogenese der Multiplen Sklerose bisher unbekannt ist, gibt es auch noch keine kausale Therapie. Akute Krankheitsschübe können durch kurzzeitige hochdosierte Kortikosteroidgaben abgeschwächt und abgekürzt werden. Der Langzeitverlauf der Erkrankung wird hierdurch wahrscheinlich nicht beeinflusst.

Die weniger eingreifende immunmodulatorische Dauertherapie hat zum Ziel, die Schubfrequenz zu senken. Zum Beispiel ließ sich durch rekombinantes Interferon- β sowohl die Entwicklung kernspintomographisch nachweisbarer Läsionen als auch der klinische Krankheitsverlauf der schubförmigen und der sekundär progredienten MS-Verlaufsformen günstig beeinflussen (Jacobs et al., 1995; Ebers & PRISM (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis), 1998; Bashir & Whitaker, 1998; Noseworthy et al., 1999; Liu & Blumhardt, 1999; Hohlfeld, 1999; Bereznoi et al., 1999). Auch für das synthetische Polypeptidgemisch Glatirameracetat (Johnson et al., 1995; Mancardi et al., 1998) und intravenöse Immunglobuline (Fazekas et al., 1997; Sörensen et al., 1998; Stangel et al., 1998; Lisak, 1998; Noseworthy et al., 1999) gibt es Wirksamkeitshinweise bei der schubförmigen MS.

Bei besonders ungünstigen Verlaufsformen mit rapider klinischer Verschlechterung kann eine Therapie mit verschiedenen Immunsuppressiva und Zytostatika wie Mitoxantron in Betracht kommen (Hartung et al., 1998). Wegen der Langzeitrisiken unspezifischer Immunsuppressiva wie Kardiotoxizität und erhöhtes Malignomrisiko muß die Indikation für diese Medikamente in jedem Einzelfall sorgfältig abgewogen werden. Für experimentelle Therapieansätze aus EAE-Modellen wie „orale Toleranzinduktion“ oder „T-Zellvakzinierung“ (Zipp & Hohlfeld, 1994) konnte bisher keine klinischen Wirksamkeitsnachweise erbracht werden (Wiendl et al., 2000). Neben den

immunsuppressiven und immunmodulierenden Therapien konnte im Lauf der letzten 10 Jahre die symptomatische Therapie der MS-Komplikationen erheblich verbessert werden, sodass heute ein breites Therapiespektrum zur Linderung der Beschwerden der MS-Patienten zur Verfügung steht.

III MATERIAL UND METHODEN

III.1 Isolation von Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL)

Die Lymphozyten des peripheren Blutes von MS Patienten und Kontrollpersonen wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Hypaque (Lymphoprep; Nyegaard, Norwegen) gewonnen.

Unter Verwendung von EDTA-Monovetten wurden 15 ml venöses Blut mit gleichem Volumen PBS, bestehend aus 0,2 g KCL, 8,0 g NaCl, 1,42 g Na₂HPO₄ und 1,38 g NaH₂PO₄-H₂O (pH 7,4), gemischt und in zwei 50 ml Falcon-Tubes im nächsten Schritt vorsichtig auf 20ml Ficoll-Hypaque (Lymphoprep; Nyegaard, Norwegen) überschichtet und vierzig Minuten mit 1400 UPM (+15°C) zentrifugiert.

Daraufhin wurden die Lymphozyten, die sich in der Interphase zwischen Serum und Lymphoprep gesammelt hatten, mittels elektrischer Saugpipette abgenommen, in einem 50 ml Falcon-Tube vereint und zwanzig Minuten mit 1400 UPM (+4°C) zentrifugiert.

Das dabei entstandene Lymphozyten-Pellet wurde in 0,5ml PBS mit 1% BSA (Rinderalbuminserum) aufgenommen und in ein „Biopur“-Eppendorf-Tube gegeben.

Daraus wurden 5µl entnommen, mit 45µl PBS und 50µl Trypan-Blau verdünnt und die Lymphozyten-Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Blau gefärbte Zellen entsprachen avitalen Zellen mit nicht mehr intakter Zellwand.

III.2 Selektion von Lymphozyten-Subpopulationen

Zur Selektion CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen wurden jeweils ca. 15-20x10⁶ Mio. in PBS suspendierte Lymphozyten ca. 350 Mio. Antikörper-beschichteten Magnetpartikeln (Dynabeads®, Dynal, Hamburg) gegen CD4 oder CD8 30 Minuten bei +4°C auf einem rotierenden Mixer inkubiert. Zur Selektion CD25⁺ und CD38⁺ Subpopulationen wurde in einem ersten Schritt mit einem unmarkierten, monoklonalen Maus-Anti-Human CD25/38 Primärantikörper 45 Minuten inkubiert und im zweiten Schritt mit einem Magnetpartikel-gekoppelten anti-Maus-IgG Sekundärantikörper weitere 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die Teströhrchen für 1-3 Minuten an einen Magneten

(Dyna) gestellt. Die spezifisch an die jeweiligen Magnetpartikel gebundenen Zellen wurden durch das Magnetfeld an die Wand des Teströhrchen gezogen.

Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt, während die spezifisch an die jeweiligen Magnetpartikel gebundenen Zellen durch das Magnetfeld an der Wand des Teströhrchen haften blieben.

Im nächsten Schritt wurde der Magnet entfernt und die an die jeweiligen Magnetpartikel gebundenen Zellen in 1ml PBS resuspendiert.

Die vorangegangenen Waschschrirte wurden drei mal wiederholt, und die auf diese Weise gewonnenen Lymphozyten-Subpopulationen mit 250 µl PBS suspendiert.

Daraufhin erfolgte ein erneuter Zählvorgang mittels Neubauer-Zählkammer.

Bei der Isolierung von CD4+, bzw. CD8+ T-Zellen konnten Zellzahlen zwischen $0,6 \times 10^6$ und $2,7 \times 10^6$ pro 30ml entnommenen Blutes erreicht werden, bei Isolierung von CD25+ bzw. CD38+ T-Zellen zwischen 10×10^3 und 20×10^3 .

In vorangegangenen Experimenten konnte eine Reinheit von 69% (CD8), 81% (CD38) und 94% (CD4) erreicht werden.

III.3 Isolierung von Lymphozyten aus dem Liquor

7-10 ml Liquor von MS-Patienten wurde 20 Minuten bei 1600 U/Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und die Leukozyten wurden unter Verwendung von Trizol-LS-Reagenz (GIBCO-BRL, Eggenstein) lysiert. Als nächster Schritt folgte die **Gesamt-RNA-Isolation (s.u.)**.

III.4 Vorbereitung des Hirngewebes für die Gesamt-RNA-Isolation.

Zwanzig 10-20µm dicke Kryostatschnitte wurden in vorgekühltes Eppendorftube überführt und mit Trizol-LS-Reagenz behandelt.

III.5 Gesamt-RNA-Isolation mit TRIZOL-LS

1.) Lyse/Homogenisierung:

Die in 250 µl Medium gelösten Zellen wurden durch wiederholtes Pipettieren mit 750 µl Trizol-LS-Reagenz (GIBCO-BRL, Eggenstein) lysiert und anschließend fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Dissoziation des Nucleoproteinkomplexes zu erreichen.

2.) Phasenseparation

Danach wurde 200 µl Chloroform hinzugegeben, 15 Sekunden kräftig per Hand geschüttelt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte eine Zentrifugation der Proben für 15 Minuten bei 14000 UPM und 4°C.

Nach der Zentrifugation trennt sich das Probengemisch in eine untere rötliche Phase, die aus Phenol-Chlorophorm besteht, in eine Interphase und in eine obere farblose wässrige Phase. Die RNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase.

3.) RNA-Ausfällung

Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Zur RNA-Ausfällung wurden 700 µl Isopropylalkohol und als Fällungshilfe 10 µl Glycogen zugegeben, 10 Minuten bei -20°C inkubiert und anschließend 20 Minuten mit 14000 UPM (4°C) zentrifugiert.

Das dabei entstandene RNA-Präzipitat formt ein Gel-ähnliches, etwa stecknadelkopfgroßes Plättchen.

4.) Waschen der RNA

Der Überstand wurde entfernt und das RNA-Plättchen wurde gewaschen, indem 1 ml 80% Ethanol zugegeben wurde, leicht geschüttelt wurde und anschließend 5 Minuten mit 14000 UPM (4°C) zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen.

5.) Auflösen der RNA

Am Ende des Verfahrens ließ man das RNA-Plättchen einige Minuten lufttrocknen und löste es anschließend in 22 µl Nuclease-freiem Wasser (Diethylpyrocarbonat-(DEPC-) behandelt). 2 µl der Lösung wurden zur Bestimmung der Konzentration entnommen.

6.) Konzentrationstest

Die RNA-Konzentration wurde mittels Spektralphotometrie bestimmt, wobei die Probe im Verhältnis 1:40 mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen wurde.

Die Konzentration wurde nach folgender Gleichung errechnet:

$$c = OD_{260} \times f \times n [mg / dl]$$

c = Konzentration

OD = optische Dichte

f = Verdünnungsfaktor

n = 40 mg/dl für RNA

Die Reinheit der präparierten RNA wurde über das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} ermittelt.

III.6 Synthese der komplementären Desoxyribonucleinsäure mittels reverser Transkription

Aus 2-5 µg Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von oligo-(dt) als Primer und reverser Transkriptase (Superscript II, GIBCO-BRL) komplementäre DNA (cDNA) erstellt, die deutlich stabiler ist als mRNA.

Im ersten Schritt wurde zu 2-5 µg m-RNA 0,5 µg oligo-(dt)₁₂₋₁₈ Primer, der sich an das Poly-A-Ende des m-RNA-Stranges anlagerte, gegeben und für 10 Minuten im Heizblock bei 70°C denaturiert. Anschließend wurde die Probe schnell auf Eis abgekühlt und dann kurz abzentrifugiert, um die Probe zu sammeln.

Anschließend wurde der Probe 4 µl 5X „First Strand“ Puffer, 2 µl 0,1 mM DTT (Antioxidans), 1 µl 10 mM dNTP (Nukleotide), 1 µl RNase Inhibitor (10 U) zugegeben und 2 Minuten im Heizblock bei 42°C gemischt.

Daraufhin wurde 1 µl (200U) Superscript II (GIBCO-BRL) beigelegt und 50 Minuten bei 42°C inkubiert.

Abschließend erfolgt die Inaktivierung der Reaktion durch 15 minütiges Erhitzen auf 70°C.

Der Probe wurde 50 µl Wasser zugegeben, sodass eine Konzentration von etwa 200 µg RNA / 1 ml Probe vorlag. Das Syntheseprodukt wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

III.7 Identifikation klonal expandierter T-Zell Populationen durch CDR3-Spektratyping

Die Suche nach einer klonal expandierten T-Zell Population stellt sich technisch kompliziert dar: Frühere Methoden waren hinsichtlich des Zeitaufwandes, der Sensitivität und der Objektivität nicht zufriedenstellend. Als Beispiele hierfür sind das Sequenzieren nach dem Zufallsprinzip, RNase Protektions Assays (Okada et al., 1989; Singer et al., 1990) und die Analyse der BV-Ketten mittels spezifischer monoklonaler Antikörper (Genevée et al., 1994). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Erstellung von TCR-Mini-Bibliotheken in *E. coli* Bakterien durch Anker- oder inverse PCR, deren Kultivierung und Sequenzierung (Lieux-Laucat et al., 1993, Uematsu 1991).

Der Vorteil des CDR3-Sektratypings liegt in der Unabhängigkeit von in-vitro Wachstum und der Systematik der Untersuchung, welche das gesamte T-Zell Rezeptor Repertoire eines Individuums (der untersuchten Zellpopulation) wiedergibt.

III.7.1 AUFBAU DES T-ZELL REZEPTORS

Die Technik des CDR3-Spektratyping macht sich die Besonderheiten des TCR-Aufbaues sowie der genetischen Kodierung auf DNA- und RNA-Ebene zunutze.

Das Protein besteht aus einer α - und einer β -Kette. Diese setzen sich aus jeweils einem konstanten Teil, der an der Zelloberfläche haftet, und einem variablen Teil, der der Antigenerkennung dient, zusammen. Dieser variable Teil setzt sich aus der V(ariable)-, der D(iversity)- und der J(oining)-Domäne zusammen.

In der Keimbahn des Menschen liegt der DNA-Code des Proteins linear angeordnet vor. Für jeden Baustein gibt es unterschiedliche Ausführungen. Während der somatischen Rekombination entstehen funktionsfähige Exons, die jeweils eine mögliche Ausführung enthalten. Zwischen den Gensegmenten werden an definierten Stellen Basenpaare nach dem Zufallsprinzip eingeschoben. Das rekombinierte Gen-Element bildet zusammen die sogenannte „dritte hypervariable“ oder auch „CDR3“-Region („3. complementarity determining region“). Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung spezifischer Antigene. Die so entstandene DNA ist spezifisch für diese eine T-Zelle und wird von ihr zu m-RNA („messenger-RNA“) transkribiert, woraus der Rezeptor als Protein translatiert wird.

Ausgangsprodukt für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation war mRNA, welche aus Hirngewebe, aus Liquor und verschiedenen Subpopulationen des peripheren Blutes gewonnen wurde.

III.7.2 BV- UND BJ-FAMILIEN SPEZIFISCHE PCR

Die gewonnene m-RNA ist aus je einer Variante für V(ariable)-D(iversity)-J(oining)-C(onstant) zusammengesetzt. Diese Einzelbausteine sind linear angeordnet. Zwischen den V-D-J Segmenten können sich nach dem Zufallsprinzip eingeschobene N-Nukleotide befinden.

Diese Genfragmente kodieren jeweils für eine Kette des T-Zell Rezeptors (TCR), welche sich als Protein mit einer anderen Kette paart und somit wiederum die Variabilität des TCR erhöht. Eine Zuordnung der beiden Ketten zueinander ist auf Ebene der Gesamt-RNA nicht möglich.

Die überwiegende Zahl der TCR besteht aus einer α - und einer β -Kette. Für die V-Region der β -Kette sind 52 Varianten bekannt, für die D-Region 2 und für die J-Region 13. Im Falle der α -Kette sind etwa 70 alternative V-Regionen und etwa 61 J-Regionen bekannt..

Die Untersuchungen mit Hilfe des CDR3-Spektratyping wurden an der β -Kette durchgeführt, wobei 26 verschiedene Primer für die V-Region (Pannetier et al., 1995; Schwab et al., 1997) verwendet wurden, welche die 52 Varianten zu „Familien“ zusammenfassen. Am 3'-Ende wurde als Primer C β R eingesetzt.

In der „Erstrunden-PCR“ wurde unter sterilen Bedingungen in 96-Well-Mikrotiterplattenplatten angesetzt. Das Volumen des Reaktionsansatzes pro Well betrug 50 μ l und setzte sich wie folgt zusammen:

- 2,5 μ l BV Primer (0,5 μ M Endkonzentration)
- 2,5 μ l CB-R Primer (0,5 μ M Endkonzentration)
- 1,0 μ l cDNA Aliquot
- 0,5 μ l dNTP (20 mM)
- 5,0 μ l 10x PCR Puffer
- 0,2 μ l Taq-Polymerase (AmpliTaq®Gold, Konzentration 5 U/ μ l)
- 38,3 μ l Wasser

Die PCR Reaktion selbst lief in folgenden Schritten ab:

- 1.) Vorinkubation 6 Minuten, 94°C
- 2.) 1 Minute, 94°C
- 3.) „Annealing“ 1 Minute, 59°C
- 4.) „Extention“ 1 Minute, 72°C, verlängerte sich jeden Zyklus um 3 Sekunden
- 5.) Wiederholung von 2.) - 4.) 40x.
- 6.) Letzte Extention 7 Minuten, 72°C
- 7.) Kühlung, 4°C

Handelte es sich um cDNA von Lymphozyten des peripheren Blutes wurden 40 Zyklen durchgeführt, bei cDNA von Lymphozyten des Liquors und des Hirngewebes wurden 45 Zyklen durchgeführt. Bei Durchführung einer semiquantitativen PCR wurde nach 35,40 und 45 Zyklen PCR-Produkt entnommen.

In dieser ersten PCR entstanden also 26 verschiedene „BV-Familien“-spezifische Produkte aus der ursprünglichen cDNA.

Um zu überprüfen, ob die Amplifikation erfolgreich abgelaufen ist, wurde die amplifizierte DNA im Agarose-Gel unter Zugabe von Ethidium-Bromid elektrophoretisch aufgetrennt und im UV-Licht betrachtet.

Dazu wurden 2,5g Agarose in 250ml 1x TBE aufgelöst, in der Mikrowelle 3 Minuten aufgeköcht und anschließend mit 6µl Ethidium-Bromid (10mg/ml) versetzt. Daraus wurde ein Gel mit Taschen gegossen, das nach ca. 30 Minuten ausgehärtet war. Je 6µl der 26 PCR-Produkte wurden mit 4µl Ladepuffer gemischt und in die Taschen eingefüllt. Zur Kontrolle wurden 4µl eines Längenmarkers mit 4µl Ladepuffer gemischt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

Die Kammer, in die das Gel gesetzt wurde, wurde mit 1x TBE aufgefüllt. Es wurde 30 Minuten eine Spannung von 100 Volt angelegt. Ethidium-Bromid, welches mit der DNA-Doppelhelix interkaliert, besitzt die Eigenschaft unter UV-Licht zu fluoreszieren. Auf diese Weise werden die längenmäßig aufgetrennten DNA-Fragmente als Banden sichtbar.

In einer zweiten PCR wurde von den Produkte mit fluoreszenzmarkierten Primern (Farbstoffe HEX, FAM, TET), welche spezifisch an die 13 unterschiedlichen J-

Regionen bzw. an die c-Region binden, „Run-off“ Transkripte erstellt. Alle 26 Produkte der ersten PCR wurden hiermit subamplifiziert.

Insgesamt entstanden so 364 Produkte (Puisieux et al., 1994).

In 96-well-Mikrotiterplatten wurden unter der sterilen Arbeitsbank 5,0 µl BJ- bzw. BC-spezifischen fluoreszenzmarkierten Primer (0,1 µM Konzentration) vorgelegt und in zwölf „Biopur“ Eppendorf-Reaktionsgefäßen als Mastermix die weiteren Reagentien beigefügt.

Außerhalb der sterilen Arbeitsbank wurden die PCR-Produkte der „Erstrunden-PCR“ hinzugefügt. Pro well wurden zwei bzw. drei BV-spezifische PCR-Produkte kombiniert.

Aus dem Mastermix wurde dann zu den vorgelegten Primern folgendes hinzugefügt:

- 0,1 µl dNTP (20 mM)
- 1,0 µl 10x PCR Puffer
- 0,04 µl Taq-Polymerase (AmpliTaq® Gold, Konzentration 5 U/µl)
- 1 µl der BV-spezifische PCR-Produkte
- 0,86µl Wasser bei drei PCR-Produkten, 1,86 µl Wasser bei zwei Produkten.

Die Kombination der BV-Familien wurde aufgrund der spezifischen Länge der Amplifikationsprodukte festgelegt:

BV1 + BV18 +BV23	BV9 + BV16
BV2 + BV4 + BV8	BV11 + BV12
BV3 + BV13.1	BV15 + BV13.2
BV5.2 + BV5.1	BV14 + BV17
BV6 + BV20	BV19 + BV24
BV7 + BV22	BV10 + BV21

Der Reaktionsansatz betrug pro well 10 µl und wurde mit einem Tropfen Nujol-Öl abgedeckt.

Die PCR-Maschine wurde für die Zweitunden-PCR folgendermaßen programmiert:

„Run-OFF-5“:

- 1.) Vorinkubation 10 Minuten, 94°C
- 2.) 1 Minute, 94°C
- 3.) Annealing 1 Minute, 59°C
- 4.) Extention 10 Minute, 72°C

- 5.) Wiederholung von 2.) - 4.) 5x
- 6.) Kühlung, 4°C

Gemeinsam sind den Transkripten eines solchen Produktes die Art der Fluoreszenzmarkierung, die Zugehörigkeit zu einer BV-Familie am 5'-Ende und zu einer BJ-, bzw. C-Region am 3'-Ende. Unterschiede weisen die Transkripte innerhalb eines PCR-Produktes hinsichtlich der D-Region und der zufällig eingeschobenen Nukleotide auf. Hierdurch kommt es zu Längenunterschieden der Fragmente.

Mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes werden die Fragmente innerhalb ihrer Produkt-Gruppe der Länge nach aufgetrennt und stehen zur Spekatyping-Analyse zu Verfügung.

III.7.3 FRAGMENT-ANALYSE DER PCR-PRODUKTE

Die Fragment-Analyse zeigt die Aufteilung der amplifizierten Transkripte hinsichtlich ihrer Nukleotid-Anzahl, d.h. ihrer Länge. Die Anzahl der Transkripte einer Länge bestimmt die Leuchtintensität der fluoreszierenden Partikel. Die graphische Darstellung des Ergebnisses zeigt eine Gauß-Kurve.

Die Überrepräsentanz einer bestimmten Sequenzlänge innerhalb eines PCR-Produktes stellt sich als Peak dar, der aus der Gauß-Kurve herausragt. Eine solche Abweichung aus der Normalverteilung legt die Vermutung nahe, dass es sich um eine klonal expandierte Population von T-Zellen handelt (Abb. 5 und 6). Die Sensitivität dieser Methode zum Nachweis eines einzelnen expandierten T-Zell-Klons innerhalb einer polyklonalen Population liegt bei etwa 1:5000 Zellen (unsere eigenen Ergebnisse; (Cochet et al., 1992)).

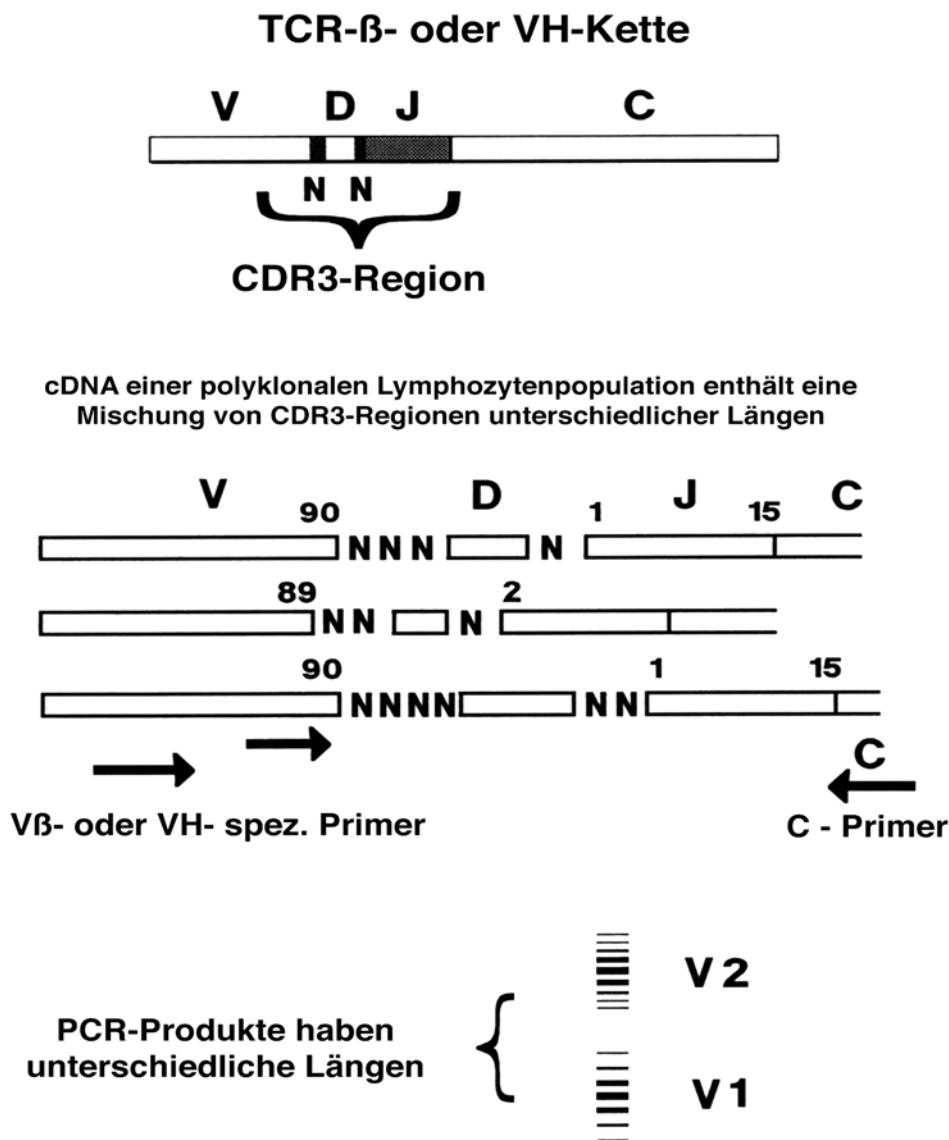


Abbildung 5: Die hypervariable (sog. CDR3-)Region der α - und β -Kette des T-Zell Rezeptors ist für die Antigenerkennung verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe der PCR in c-DNA transkribierte m-RNA des Ausgangsmaterials amplifiziert und fluoreszenzmarkiert.

Die Abbildung zeigt schematisch die Auftrennung der markierten DNA-Fragmente nach ihrer Länge. Nach der ersten PCR („Immuno“) besteht das PCR-Produkt aus amplifizierten DNA-Fragmenten einer BV(Variabel)-Familie, da diese als Primer der Reaktion vorgegeben war. Die C-(Constant)Region ist ebenfalls identisch. Unterschiedlich sind die DNA-Fragmente bezüglich der D-(Diversity) und J-(Junction)Region, sowie in Art und Zahl der zufällig eingeschobenen N-Nukleotide. Nach dem Prinzip der Normalverteilung ist eine mittlere Größe an DNA-Fragmenten am häufigsten vertreten, extrem lange und extrem kurze Sequenzen sind selten. Dementsprechend gibt die graphische Darstellung der markierten DNA-Fragmente eine Gauß-Verteilung (modifiziert nach Gorski et al., 1995)

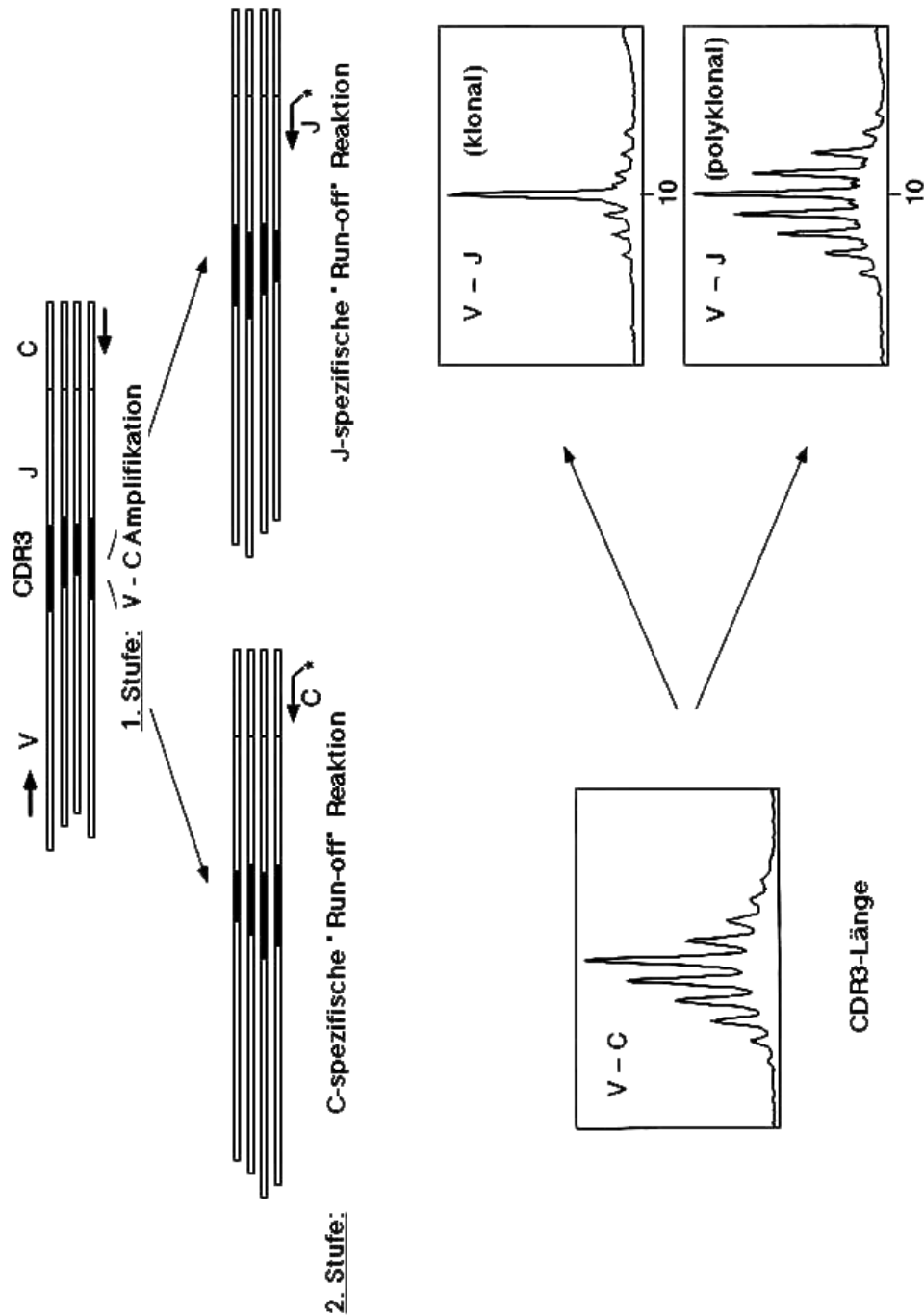


Abbildung 6: Schematische Darstellung des CDR3-Spektratyping: Die zweistufige PCR-Reaktion mit Fluoreszenz-markierten C β -(niedrige Sensitivität) und J β -(hohe Sensitivität) „Runoff“-Primern stellt polyklonale Lymphozytenpopulationen als Gauß-verteilte CDR3-Spektragramme dar, während klonal expandierte Lymphozytenklone als „Peaks“ identifiziert werden können (modifiziert nach Pannetier et al., 1995).

Der genaue technische Ablauf dieser Methodik wird im Folgenden beschrieben:

Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden über ein 5 % Polyacrylamid-6M Harnstoff Sequenzier Gel (Long Ranger® Single Pack, BioWhittaker Molecular Applications, Rockland) elektrophoretisch aufgetrennt und unter Verwendung eines automatischen Sequenziergerät (ABI377®, Applied Biosystems, Weiterstadt) einer bestimmten Basenpaarlänge zugeordnet. Dies war möglich, weil mit den Proben auf jeder Spur der mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA markierte Längenstandard GeneScan-350 TAMRA (Applied Biosystems) aufgetragen wurde, der einzelsträngige Fragmente von 35 bis 350 Basenpaaren enthält.

Da für die fluoreszenzmarkierten BJ-Primer drei verschiedene Farbstoffe (HEX, FAM, TET) zu Verfügung standen und TAMRA als eine weitere Farbe identifiziert werden konnte, liefen pro Spur drei verschiedene BJ-Sub-Familien von jeweils zwei bzw. drei BV-Familien. Diese konnten aufgrund der Längenunterschiede bereits in der „Run-Off-PCR“ gemeinsam amplifiziert werden.

In eine Mikrotiterplatte wurden also jeweils 1µl von drei PCR-Produkten, die mit Primern der drei unterschiedlich markierten Farben gewonnen worden waren, zusammenpipettiert.

Die Kombinationen ergaben sich wie folgt (eine Zeile entspricht einer Spur auf dem Gel):

(BV 1 + BV 18 + BV 23) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)

(BV 1 + BV 18 + BV 23) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)

(BV 1 + BV 18 + BV 23) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)

(BV 1 + BV 18 + BV 23) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)

(BV 1 + BV 18 + BV 23) x (BJ 2.7 HEX + Cβ TET)

(BV 2 + BV 4 + BV 8) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)

(BV 2 + BV 4 + BV 8) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)

(BV 2 + BV 4 + BV 8) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)

(BV 2 + BV 4 + BV 8) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)

(BV 2 + BV 4 + BV 8) x (BJ 2.7 HEX + Cβ TET)

(BV 3 + BV 13.1) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)
(BV 3 + BV 13.1) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)
(BV 3 + BV 13.1) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)
(BV 3 + BV 13.1) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)
(BV 3 + BV 13.1) x (BJ 2.7 HEX + C β TET)

(BV 5.2 + BV 5.1) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)
(BV 5.2 + BV 5.1) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)
(BV 5.2 + BV 5.1) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)
(BV 5.2 + BV 5.1) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)
(BV 5.2 + BV 5.1) x (BJ 2.7 HEX + C β TET)

(BV 6 + BV 20) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)
(BV 6 + BV 20) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)
(BV 6 + BV 20) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)
(BV 6 + BV 20) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)
(BV 6 + BV 20) x (BJ 2.7 HEX + C β TET)

(BV 7 + BV 22) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)
(BV 7 + BV 22) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)
(BV 7 + BV 22) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)
(BV 7 + BV 22) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)
(BV 7 + BV 22) x (BJ 2.7 HEX + C β TET)

(BV 9 + BV 16) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)
(BV 9 + BV 16) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)
(BV 9 + BV 16) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)
(BV 9 + BV 16) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)
(BV 9 + BV 16) x (BJ 2.7 HEX + C β TET)

(BV 11 + BV 12) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)
(BV 11 + BV 12) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)

(BV 11 + BV 12) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)

(BV 11 + BV 12) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)

(BV 11 + BV 12) x (BJ 2.7 HEX + C β TET)

(BV 15 + BV 13.2) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)

(BV 15 + BV 13.2) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)

(BV 15 + BV 13.2) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)

(BV 15 + BV 13.2) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)

(BV 15 + BV 13.2) x (BJ 2.7 HEX + C β TET)

(BV 14 + BV 17) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)

(BV 14 + BV 17) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)

(BV 14 + BV 17) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)

(BV 14 + BV 17) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)

(BV 14 + BV 17) x (BJ 2.7 HEX + C β TET)

(BV 19 + BV 24) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)

(BV 19 + BV 24) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)

(BV 19 + BV 24) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)

(BV 19 + BV 24) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)

(BV 19 + BV 24) x (BJ 2.7 HEX + C β TET)

(BV 10 + BV 21) x (BJ 1.1 HEX + BJ 1.2 FAM + BJ 1.3 TET)

(BV 10 + BV 21) x (BJ 1.4 HEX + BJ 1.5 FAM + BJ 1.6 TET)

(BV 10 + BV 21) x (BJ 2.1 HEX + BJ 2.2 FAM + BJ 2.3 TET)

(BV 10 + BV 21) x (BJ 2.4 HEX + BJ 2.5 FAM + BJ 2.6 TET)

(BV 10 + BV 21) x (BJ 2.7 HEX + C β TET)

Zur Volumenreduktion wurden die „Runoff“ Transkripte 25 Minuten bei 85°C eingedampft. Den eingedampften Proben wurde 4 μ l TAMRA-Mix, bestehend aus 0,5 μ l TAMRA (4 ν m), 1,0 μ l Ladepuffer (blaues Dextran, 50 mg/ml; EDTA, 25 mM) und 2,5 μ l deionisiertem Formamid, hinzugegeben. Nach der darauffolgenden Denaturierung (5Minuten bei 85°C) wurden die Proben auf Eis gestellt.

Zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurden Long Ranger™ gel solution und ABI Prism 377 36cm Glasplatten verwendet. Um Taschen zum auftragen der Proben zu formen wurde ein 36-Well Kamm eingespannt. Die Polymerisation dauerte 2h.

Am Sequenzier-Gerät wurde das Programm „Genscan“ gestartet, die Pufferkammer mit 1xTBE gefüllt und der Vorlauf zur gleichmäßigen Erhitzung der Platte auf 51°C durchgeführt. Vor dem Starten des eigentlichen Laufes wurden die Gel-Taschen mit den Proben beladen, eine Spannung von 3000 Volt angelegt. Die Dauer der Elektrophorese betrug 2h.

Die Auswertung des Ergebnisses wurde unter Verwendung der Genescan®-Software und einer, in Bezug zu den verwendeten Farbstoffen, vordefinierten Matrix durchgeführt. Die ausgedruckten Kurven spiegeln den Längenpolymorphismus der CDR3-Region wieder.

III.8 Sequenzierung

III.8.1 SUBAMPLIFIKATION

Expandierte Kandidaten der BV-BJ-Subpopulationen wurden aus dem initialen BV-Cß Amplifikationsprodukt (aus der „Erstrunden-PCR“) erneut mit dem entsprechenden BV-BJ-Primerpaar subamplifiziert.

In einigen Fällen wurde an Stelle des BJ-Familien Primers ein sog. „klonspezifischer“ Primer verwendet (siehe Tabelle Ia und Ib). Die Sequenzen der verwendeten klonzspezifischen BJ-Primer lauten wie folgt: F.E. BV1-BJ1.3 5'-AAA ATA CTG CGT ATC CTT CCT-3'; F.E. BV9-BJ2.7 5'-CCC GAA GTA CTG CTC GCC GAC-3'; F.E. BV22-BJ2.1 5'-GAA CTG CTC ATT GTG TTC TCC-3'.

Es wurden je 2,5 µl unmarkierte BV- und BJ-Primer (10 µM) verwendet.

Die Zusammensetzung der Reaktionsproben entspricht ansonsten dem der „ErstrundenPCR“. Es wurden 25 PCR-Zyklen durchgeführt. Pro Well wurde jeweils nur eine BJ-Sub-Familie einer BV-Familie amplifiziert.

III.8.2 PROBENAUFREINIGUNG

Daraufhin erfolgte eine Aufreinigung mit Microcon 30® Säulen (Amicon, Beverly, USA) mit einer molekularen Ausschlußgröße von 30.000 Dalton.

Pro Probe wurden jeweils 2 Microcon 30® Hütchen mit

- a) „wash“
- b) „Eluat“

beschriftet. Die Microcon-Säulen wurden in einer Eppendorf-Zentrifuge mit großer Öffnung nach oben in „wash“-Hütchen gestellt und mit 200 µl Wasch-Puffer (2 mM PCR Puffer ohne Magnesium) befüllt. Zu diesem wurde 20 µl PCR Produkt hinzugegeben, ohne die Membran zu berühren. Nun wurden die Säulen 10 Minuten bei 11 000 UPM und Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Elution wurden 10 µl Wasch-Puffer pipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so daß sich die DNA-Fragmente darin lösen konnten. Um die DNA als Eluat zu gewinnen wurden die Säulen umgedreht und in das zugehörige „Eluat“- Hütchen geben, daraufhin 15 Sekunden bei 10 000 UPM zentrifugiert und mit Nuclease-freiem Wasser auf 30 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

III.8.3 SEQUENZIER-REAKTION

Das „Cycle Sequencing“ wurde nach der Didesoxy-Abbruch-Methode durchgeführt, wobei nach dem Prinzip der PCR zur vorgelegten DNA komplementäre Stränge entstanden, die durch zufälligen Einbau von 2,3-Didesoxynucleotid-5'-Triphosphaten jedoch an unterschiedlichen Stellen die Extensionsreaktion abbrechen. Diese terminierenden Triphosphate sind fluoreszenzmarkiert: Adenosintriphosphat mit dichloro[R110] und Thymintriphosphat mit dichloro[ROX]. Die durch die zufälligen Abbrüche entstehenden Stänge unterschiedlicher Länge markieren nun jede Position der Sequenz farblich. Nach Denaturierung können die Proben im Sequenzer elektrophoretisch aufgetrennt werden und vom Laser die farblich kodierten Sequenzen abgelesen werden.

Als Startpunkte für die Extension der komplementären Stränge wurden unmarkierte BJ- und BV-Primer benützt. Um Strang und Gegenstrang zu sequenzieren wurden für jedes

PCR-Produkt zwei Reaktionen angesetzt, einmal mit dem BV-spezifischen Primer und einmal mit dem BJ- bzw. C β R-spezifischen Primer.

Die Sequenzierreaktion wurde in 96-well-Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei pro Well 1 μ l unmarkierter Primer (10 μ M), 2 μ l Sequenzier-Mix (beinhaltet Deoxy- und Didesoxynukleotide, Dye-markierete Primer und AmpliTaq DNA Polymerase), 6 μ l Eluat und 6 μ l DEPC-behandeltes Wasser angesetzt und mit einem Tropfen Nujol-Öl bedeckt wurde.

Die PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

- 1.) 30 Sekunden, 94°C
- 2.) Annealing 15 Sekunden, 55°C
- 3.) Extention 4 Minute, 60°C
- 4.) Wiederholung von 1.) - 3.) 25x
- 5.) Kühlung, 10°C

III.8.4 AUFREINIGUNG DES REAKTIONSANSATZES

Um die Proben von Restbeständen an Primern, Nujol-Öl, fluoreszenzmarkierten Nucleotiden u.ä. zu befreien, erfolgte eine Aufreinigung mittels QIAquick® Säulen (Qiagen, Hilden, D.).

Hierzu ließ man die Säulen mit 750 μ l Wasser 30 Minuten zu einem Gel verquellen, die überständige Flüssigkeit wurde verworfen, und die Säulen 2 Minuten bei 3000 UPM zentrifugiert. Dann wurde der Reaktionsansatz (15 μ l) auf die Mitte des Gels pipettiert ohne das Gel mit der Pipettenspitze zu berühren. Um das gereinigte Eluat zu gewinnen wurden die Säulen erneut 2 Minuten bei 3000 UPM zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde das Eluat 30 Minuten in einer Vakuumzentrifuge ohne Hitzeanwendung getrocknet.

III.8.5 PROBENAUFTRAG

Der getrocknete Ansatz wurde in 3,5 μ l Formamid und 0,5 μ l Ladepuffer aufgenommen. und anschließend 2 Minuten bei 90 °C denaturiert. Es wurden dann 2,0 μ l der Probe auf ein Sequenziergel (Long Ranger®) aufgetragen. Insgesamt konnten auf diese Weise 36 Proben gleichzeitig bearbeitet werden. Die Analysesoftware des Sequenzers wurde wie folgt konfiguriert:

- Laufmodul: Seq Run 36E-2400, d.h. 36 cm Gelbreite, 2400 Scans/Stunde
- Matrix: Dye/Filter Set E (=ABI PRISM® BigDye™ Matrix Standard)

Die Laufzeit betrug 3 Stunden bei 200 W Leistung.

III.9 Verwendete Materialien

„Biopur“ Eppendorf-Tubes	Steril Pyrogenfrei RNase-frei DNA-frei ATP-frei	Eppendorf, Hamburg, D.
„Dynabeats“-Antikörper M-450 CD4	Magnetisch markierte Primär-Antikörper, 1.4x10 ¹⁰ /ml	Dynal, Hamburg, D.
„Dynabeats“-Antikörper M-450 CD8	Magnetisch markierte Primär-Antikörper, 1.4x10 ¹⁰ /ml	Dynal, Hamburg, D.
“Mouse anti-Human” Antikörper CD25 IgG2a	Nicht-markierte Antikörper, 0,2 mg/ml	Immunotech, Marseille, F.
„Mouse anti-Human” Antikörper CD38 IgG1	Nicht-markierte Antikörper, 0,1 mg/ml	DAKO, Glostrup, Denmark
„Dynabeats“-Antikörper „Rat anti-Mouse“ IgG1 CELLection Kit	Magnetisch markierte Sekundär-Antikörper, 6.6x10 ⁸ /ml	Dynal, Hamburg, D.
„Dynabeats“-Antikörper „Rat anti-Mouse“ IgG2a CELLection Kit	Magnetisch markierte Sekundär-Antikörper, 6.6x10 ⁸ /ml	Dynal, Hamburg, D.
36-well Kamm		Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
5XFirst Stand Buffer		GibcoBRL, Eggenstein, D.
80% Ethanol		Riedel-de Haen, Taufkirchen, D.
96-well-Mikrotiterplatten		Biozym, Hess. Oldendorf, D.
Agarose	Agarose LM-MP	Boehringer Mannheim, Mannheim, D.
BSA	RNase/DNase-frei	Pharmacia Biotech, Erlangen, D.
Chlorophorm		Merck, Darmstadt, D.
Cycle Sequence Mix	ABI Prism™dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit, with AmpliTaq®DANN Polymerase, FS	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D
DEPC-behandeltes H ₂ O		ICN Biomedicals, Eschwege, D.
Dextranblau		Sigma, Taufkirchen, D.

dNTP Mix	10 μ M	Pharmacia Upjohn, Erlangen, D.
DTT	0,1 M Dithiothreitol	GibcoBRL, Eggenstein, D.
Ethidium-Bromid		GibcoBRL, Eggenstein, D.
Falcon-Tubes		Sarstedt, Nürnbrecht, D.
Flache Pipettenspitzen	Miniflex 0,2mm flat Tipps	Sorenson, Amersham Bioscience, Freiburg, D.
Formamid		Merck, Darmstadt, D.
Genscan loading buffer	Genscan-500 Tamra: blue dextran, 50mg/ml; EDTA, 25 mM	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Glycogen	20mg/ml	Boehringer Mannheim, Mannheim, D.
Isopropyl-Alkohol		Riedel-de Haen, Taufkirchen, D.
Längenmarker	Low DANN mass ladder	GibcoBRL, Eggenstein, D.
Lymphoprep	Ficoll-Hypaque	Nyegaard, Oslo, Norwegen
Loading buffer	100ml Sucrose 40% 50mg Xylencyanol 50mg Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen, D. Sigma, Taufkirchen, D. Merck, Darmstadt, D
Superscript II	reverse Transkriptase	GIBCO-BRL, Eggenstein
AmpliTaq® Gold	Taq-Polymerase	Applied Biosystems, Weiterstadt
Trypan-Blau		Sigma, Taufkirchen, D.
RNaseOUT™	RNase-Inhibitor	GibcoBRL, Eggenstein, D.
Long Ranger® Single Pack	5 % Polyacrylamid-6M Harnstoff Sequenzier Gel	BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA
ABI377® Sequenzer	automatisches Sequenziergerät	Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
Microcon 30® Säulen	Säulen zur Probenaufreinigung	Amicon, Beverly, USA
QIAquick® Säulen	PCR-Aufreinigung	Qiagen, Hilden, D

IV ERGEBNISSE

IV.1 Kombination von CDR3-Spectratyping und Einzelzell-PCR zur Identifikation potentiell autoaggressiver T-Zellen in Hirnläsionen, Liquor und peripherem Blut

Beim **Patienten F.E.** wurde 1996 eine Läsion im Gehirn, die im kraniellen MRT hinweisend war auf eine malignes Gliom, operativ entfernt. Die histopathologische Untersuchung sowie der weitere klinische Verlauf mit mehreren Schüben führte zur Diagnose der Multiplen Sklerose.

Patientin P.I. wurde im May 2001 aus diagnostischen Gründen wegen einer im kraniellen Kernspintomogramm tumorverdächtigen Läsion stereotaktische biopsiert. Die histopathologische Untersuchung, die Ergebnisse der technischen Zusatzuntersuchungen sowie der weitere klinische Verlauf mit mehreren Schüben führten auch bei dieser Patientin zur Diagnose der klinisch gesicherten Multiplen Sklerose.

IV.1.1 DATEN AUS DER PCR ANALYSE VON T-ZELLEN, DIE AUS DEM GEHIRN VON MS-PATIENTEN MIKROMANIPULIERT WURDEN

(bereits veröffentlicht von Babbe et al., 2000)

Von 24 T-Zell Rezeptor Sequenzen, die aus einzelnen parenchymalen CD8+ Zellen von Patient FE identifiziert wurden, stammten 17 (71%) von 9 verschiedenen Klonen, wobei nur 7 Sequenzen einmalig waren. 46 von 52 parenchymalen CD4+ T-Zellen konnten keiner klonalen Expansion zugeordnet werden, wobei 6 zu 3 Klonen gehörten. Von den 46 Sequenzen, die von perivaskulären Zellen abstammten, konnten 26% einer klonalen Expansion zugeordnet werden. Mit Ausnahme des Klones BV13.2-BJ2.2 konnten alle Klone der CD8+ oder CD4+ Subpopulation zugeordnet werden.

**IV.1.2 CDR3 SPEKTRATYPING IST EINE VALIDE UND SENSITIVE METHODE ZUR
IDENTIFIKATION UND CHARAKTERISIERUNG EXPANDIERTER T-ZELLEN IN
GEHIRN, LIQUOR UND BLUT.**

Als Erstes analysierten wir das Hirngewebe von Patienten F.E. mit CDR3-Spektratyping. Eine Anzahl klonaler Peaks konnte vor oligoklonalem Hintergrund identifiziert werden. Diese klonalen Expansionen wurden mit TCR BV Sequenzen verglichen, die unsere Kollegen Babbe et. al. mittels Einzelzell-PCR von individuell aus Hirngewebe mikromanipulierten, infiltrierenden CD8+ T-Zellen amplifizierten (Babbe et al., 2000) und mit klonalen Expansionen, die mit CDR3-Spektratyping von Liquor-Zellen und verschiedenen T-Zell Subpopulationen des peripheren Blutes 5 Jahre nach der Hirn-Operation detektiert wurden. Übereinstimmungen fanden sich in den TCR Familien BV1, BV4, BV5.2, BV6, BV9, BV13.1, BV13.2, BV13.3, BV14, BV16, BV17 und BV22. Korrespondierende Expansionen wurden sequenziert.

Der linke Teil der **Tabelle Ia** („Einzelzell-PCR Gehirn“) zeigt eine Auflistung der häufigsten, mittels Einzelzell-PCR von Babbe et al. identifizierten, T-Zell Klone, sowohl in parenchymatösen wie auch perivaskulären Lokalisationen. Klonale Expansionen wurden durch die Amplifikation identischer T-Zell Rezeptor Sequenzen (β -Kette) von mindestens 2 unterschiedlichen Zellproben, die aus dem Gehirn mikromanipuliert wurden, identifiziert. Die Sequenz BV4-C S-V T G V A-G A N-BJ2.6 stellt beispielsweise die am häufigsten identifizierte dar. In Spalte 3 sind die Sequenzen der CDR3-Region dieser dominanten, mittels Einzelzell-PCR und CDR3-Spektratyping identifizierten T-Zell Klone aufgelistet.

Die andere Hälfte der TCR Sequenzen von expandierten T-Zell Klonen, die im Gehirn und im Liquor oder peripherem Blut mit CDR3-Spektratyping identifiziert wurden, stimmten mit keiner von Babbe et. al. mittels Einzelzell-PCR identifizierten TCR Sequenz überein. Mit Ausnahme eines T-Zell Klones konnten alle von Babbe et al. aus dem Hirnparenchym, d.h. der MS-Läsion selbst isolierten CD8+ T-Zell Klone mit CDR3-Spektratyping im Hirngewebe identifiziert und sequenziert werden (**Tabelle Ia**). Dadurch war ausgeschlossen, dass es sich bei den von uns identifizierten Sequenzen um eine bloße Kontamination mit T-Lymphozyten des peripheren Blutes handelte. Wir führten auf C β -Ebene eine semiquantitative PCR der cDNA der T-Lymphozyten des Hirngewebes durch, bei der nach 35, 40 und 45 Zyklen PCR-Produkt entnommen und daraufhin ein CDR3-Spektratyping durchgeführt wurde.

Alle oben genannten TCR Familien, mit Ausnahme von BV9, zeigten bereits nach 35 Zyklen auf C β -Ebene deutliche klonale Peaks. Dies ist ein Hinweis für den dominanten Charakter dieser T-Zell Klone.

IV.1.3 EXPANDIERTE INFILTRIERENDE T-ZELL KLONE VON MS-LÄSIONEN SIND IN BLUT UND LIQUOR NACHZUWEISEN UND PERSISTIEREN DORT ÜBER JAHRE

5 Jahre später konnten 5 dieser 10 Sequenzen mit CDR3-Spektratyping erneut im Liquor und in verschiedenen Kompartimenten des peripheren Blutes des selben Patienten detektiert und sequenziert werden. Die Sequenz BV1-C A S-T P E R D P S-N E Q-BJ2.1 wurde im CD8+ und CD38+ (aktivierten) Kompartiment des peripheren Blutes sowie im Liquor gefunden; die Sequenz BV4-C S-V T G V A-G A N-BJ2.6 bei den CD8+ Blutzellen und im Liquor; die Sequenz BV13.3 - C A S S - P G D R A Q - BJ2.1 bei den CD8+ T-Zellen und im Liquor; die Sequenz BV14-C A S S-P L W E G G I G-N T E-BJ1.1 ebenfalls bei den CD8+ Blutzellen und im Liquor; und die Sequenz BV22-C A S S-E G A G E H - N E Q-BJ2.1 bei den CD38+ Blutzellen und im Liquor. Der rechte Teil der **Tabelle Ia** gibt die Ergebnisse der CDR3-Spektratyping Analyse des T-Zell Rezeptor Repertoires in den Kompartimenten Gehirn, Liquor und peripheres Blut wieder. Die Verwendung von „++“ wurde für eine klar lesbare Sequenz vergeben, „+“ bedeutet, dass die Sequenz nur unvollständig lesbar ist, die klonale Identität jedoch klar erkennbar ist. „KsP“ zeigt an, dass an Stelle des BJ-Familien Primers ein klonspezifischer Primer verwendet wurde, der in die D(iversity)- Segment der CDR3-Region hineinreicht. Ein „-“ weist auf eine polyklonale Population bzw. einen Peak unterschiedlicher Basenlänge im CDR3-Spektratyping hin.

In Abbildung 7 sind die Sequenzen der β -Kette der CDR3-Region des T-Zell Rezeptors des expandierten Klones BV1-BJ2.3 dargestellt, der im Hirngewebe mit Einzelzell-PCR und mit CDR3-Spektratyping detektiert wurde. 5 Jahre nach der Hirngewebeentnahme konnten wir diesen Klon im Liquor sowie im CD8+ und CD38+ (aktivierten) Kompartiment des peripheren Blutes identifizieren.

Die Abbildung 8 zeigt ein Beispiel für Peaks gleicher Basenlänge von T-Zellen des Hirngewebes, des Liquors und des peripheren Blutes im CDR3-Spektratyping mit den dazu korrespondierenden Sequenzen.

In **Tabelle Ib** ist zu sehen, dass in etwa die Hälfte der mit Hilfe von CDR3-Spektratyping erhaltenen Sequenzen, die im Gehirn von 1996 und Liquor oder Blut identifiziert wurden, keiner Sequenz der Einzelzellanalyse entsprach. Die meisten dieser Klone konnten 5 Jahre später im Liquor und einige bei den CD8+ oder CD38+ Blutzellen detektiert werden.

In unseren Untersuchungen gab es keine Überschneidungen expandierter CD4+ T-Zell Klone von Gehirn, Liquor und CD4+ Blutzellen. Babbe et al. zeigten, dass nur 12% der identifizierten rearrangierten T-Zell-Rezeptor-Gene der intrazerebralen CD4+ T-Zellen aus klonalen Expansionen zusammengesetzt sind.

Abbildung 9 zeigt ein weiteres Beispiel für CDR3-Spektratyping Peaks von verschiedenen Zellproben des Patienten F.E. und die korrespondierenden Sequenzen.

Ähnliche Ergebnisse erhielten wir bei **Patientin P.I.**, die im May 2001 aus diagnostischen Gründen wegen einer im kraniellen Kernspintogramm tumorverdächtigen Läsion stereotaktische biopsiert wurde. Die histopathologische Untersuchung, die Ergebnisse der technischen Zusatzuntersuchungen, sowie der weitere klinische Verlauf mit mehreren Schüben führte auch bei dieser Patientin zur Diagnose der klinisch gesicherten Multiplen Sklerose. Mit CDR3-Spektratyping konnten wir im Gehirn mehrere klonale Peaks identifizieren, die sich auch im Liquor und in den CD8+ und CD38+ Subpopulationen des peripheren Blutes wieder fanden. Liquor wurde 6, Blut 7 Monate nach des Hirnbiopsie gewonnen (**Tabelle II**).

Abbildung 10 zeigt das Beispiel eines mit CDR3-Spektratyping in verschiedenen Kompartimenten detektierten Klones mit den zugehörigen Sequenzen der CDR3-Region. Bei dieser Patientin zeigt sich ein identischer klonaler Peak in der CD4+ Fraktion des peripheren Blutes und im Liquor, aber nicht im Gehirn (Abb. 11).

Zusammenfassend konnten wir bei dem Patienten FE mittels CDR3-Spektratyping mit einer Ausnahme alle dominanten Sequenzen, die durch Einzelzell-PCR identifiziert wurden (Babbe et al., 2000), detektieren und sequenzieren. Dadurch war ausgeschlossen, dass es sich bei den von uns identifizierten Sequenzen um eine bloße Kontamination mit T-Lymphozyten des peripheren Blutes handelte. In etwa die Hälfte dieser Sequenzen war 5 Jahre später im Liquor und im CD8+/CD38+ Kompartiment des peripheren Blutes nachweisbar. Darüber hinaus konnten wir im Hirngewebe Sequenzen identifizieren, die keiner der mit Einzelzell-PCR identifizierten entsprach.

Jede diese Sequenzen war 5 Jahre später im Liquor und/oder in der CD8+ und/oder CD38+ Subpopulation des peripheren Blutes nachweisbar, keine in der CD4+ Subpopulation. Ähnliche Ergebnisse bekamen wir bei Patientin P.I., bei der keine Daten aus Einzelzell-PCR Analysen vorlagen.

Wir konnten also in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal zeigen, dass ein Teil der potentiell autoaggressiven, invadierenden CD8+ T-Zell Klone von MS-Läsionen des Gehirns im Liquor repräsentiert ist. Diese T-Zellen fanden sich teilweise auch in der CD8+ Subpopulation des peripheren Blutes, z.T in aktiviertem Zustand. Wir konnten weiter zeigen, dass diese T-Zell Klone über mehrere Jahre in Liquor und Blut persistieren.

Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern führten wir zusätzliche Analysen des T-Zell Repertoires von Liquor und Blut bei 6 weiteren MS-Patienten durch. Wir konzentrierten uns zum Einen auf die Frage, in wie weit aktivierte (CD25+/38+) T-Zell Klone des peripheren Blutes während eines Krankheitsschubes im Liquor repräsentiert sind. Zum Anderen analysierten wir die Langzeitpersistenz expandierter T-Zell Klone im Liquor.

Tabelle Ia F.E

Einzelzell-PCR Gehirn (Babbe et al.)		TCR BV CDR3 Sequenz	CDR3-Spektratyping				
Häufigkeit parenchymal CD8+	Häufigkeit perivaskulär CD8+		<u>Gehirn</u> 1996	<u>Liquor</u> 2001	<u>PBL</u> 2001 CD4+	<u>PBL</u> 2001 CD8+	<u>PBL</u> 2001 CD38+
1/24	1/46	BV1 - C A S - T P E R D P S - N E Q - BJ2.1	++	-	-	-	-
1/24	2/46	BV1 - C A S S - I S G R K D - T Q Y - BJ2.3	++	++, ksp	-	++	++
4/24	2/46	BV4 - C S - V T G V A - G A N - BJ2.6	++	++	-	++	-
2/24	-	BV6 - C A S S - F A A S I S - G Y T - BJ1.2	-	-	-	-	-
2/24	-	BV13.1 - C A S S - L G A - D T Q - BJ2.3	++	-	-	-	-
2/24	1/46	BV13.2 - C A S - R A L V A T - Y N E - BJ2.1	++	-	-	-	-
-	2/46	BV13.2 - C A S S - Y P - G E L - BJ2.2	++	-	-	-	-
1/24	3/46	BV13.3 - C A S S - P G D R A Q - BJ2.1	++	++	-	+	-
1/24	1/46	BV14 - C A S S - P L W E G G I G - N T E - BJ1.1	++	++	-	++	-
3/24	-	BV22 - C A S S - E G A G E H - N E Q - BJ2.1	++	++, ksp	-	-	++, ksp

Legende:

- + + klonale Expansion
- + klonale Identität vor oligoklonalem Hintergrund klar erkennbar
- polyklonal/ Peak unterschiedlicher Basenlänge im CDR3-Spektratyping
- ksP** sequenziert mit einem klonenspezifisch Primer an Stelle des BV-Primers
- # auch im CD8+ compartment (PBL) von 5'99 identifiziert

Tabelle Ib FE

TCR BV CDR3 SEQUENZ	Hirn 1996	Liquor 2001	PBL 2001 CD4+	PBL 2001 CD8+	PBL 2001 CD38+
BV52-CASS-LGGR A V-YEQ-BJ2.7	+	-	-	-	+
BV6-CASSL-GPN-YEQ-BJ2.7 #	+	+	-	+	-
BV9-CASS-PWEEGSGN-TIY-BV1.3	++	++	-	-	-
BV9-CASS-QIRGVG-EQY-BJ2.7	++	++, ksP	-	-	++
BV14-CASS-LYGGT-NSP-BV1.6	+	+	-	-	-
BV16-CASSQ-GWGREL T -TGE-BV2.2	+	+	-	-	-
BV16-CASS-GTSGK-DTQ-BV2.3	+	+	-	-	-
BV17-CASS-WAISDR-QPQ-BV1.5	++	+	-	-	-

Legende: ++ klonale Expansion
 + klonale Identität vor oligoklonalem Hintergrund klar erkennbar
 - polyklonal/ Peak unterschiedlicher Basenlänge im CDR3-Spektrotyping
ksP sequenziert mit einem klonspezifisch Primer an Stelle des BV-Primers

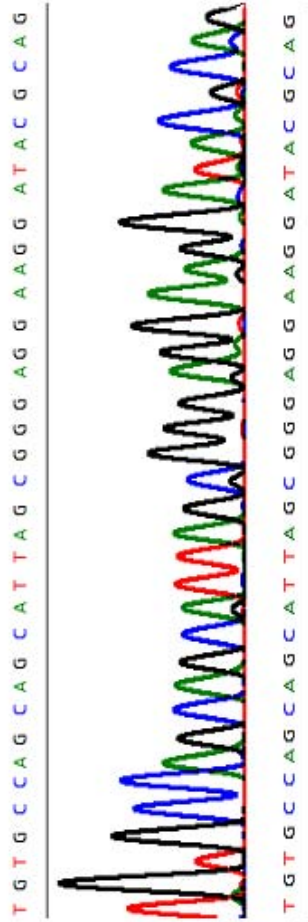
Tabelle II PI

<i>TCR BV CDR3 Sequenz</i>	<u>Gehirn</u> 05/2001	<u>Liquor</u> 11/2001	<u>PBL</u> 12/2001 CD4+	<u>PBL</u> 12/2001 CD8+	<u>PBL</u> 12/2001 CD38+
BV14-CASS-LPGGN- YEQ -BJ2.7	+	-	-	+	+
BV16-CASS- RLT DST-TDT-BJ2.3	+	-	-	+	-
BV19-CASS- HPGTGSN -EQY-BJ2.7	++	++	-	+	-
BV20-CAWS- APD -NTE-BJ1.1	+	-	-	+	-
BV23-CASS- PGRAG -SPL-BJ1.6	-	++	++	-	-
BV24-CATS- RLQGG -TGE-BJ2.2	++	++	-	-	++

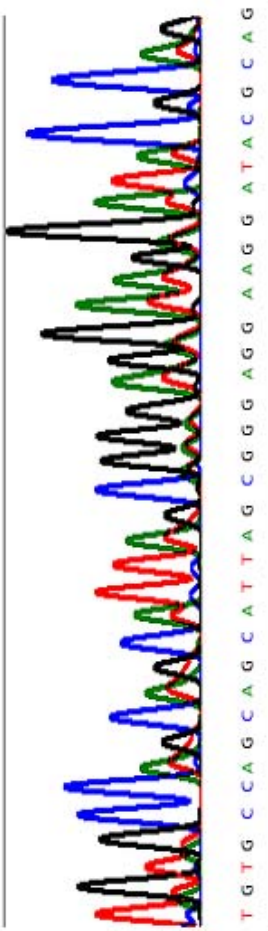
Legende:

- ++ klonale Expansion
- + klonale Identität vor oligoklonalem Hintergrund klar erkennbar
- polyklonal/ Peak unterschiedlicher Basenlänge im CDR3-Spektratyping

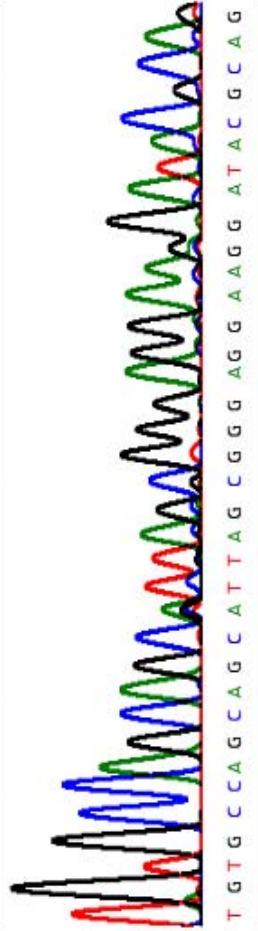
F.E. Hirnbiopsie `96



F.E. PBL `01 Liquor
klonspezifisch



F.E. PBL `01 CD8+



F.E. PBL `01 CD38+



BV1 - C A S S I S G R K D T Q Y - BJ2.3

Abbildung 7: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3-Region (β -Kette) des in Hirngewebe, Liquor, CD8+ und CD38+ T-Lymphozyten des peripheren Blutes von MS-Patienten F.E. identischen expandierten T-Zell-Klones BV1-BJ2.3.

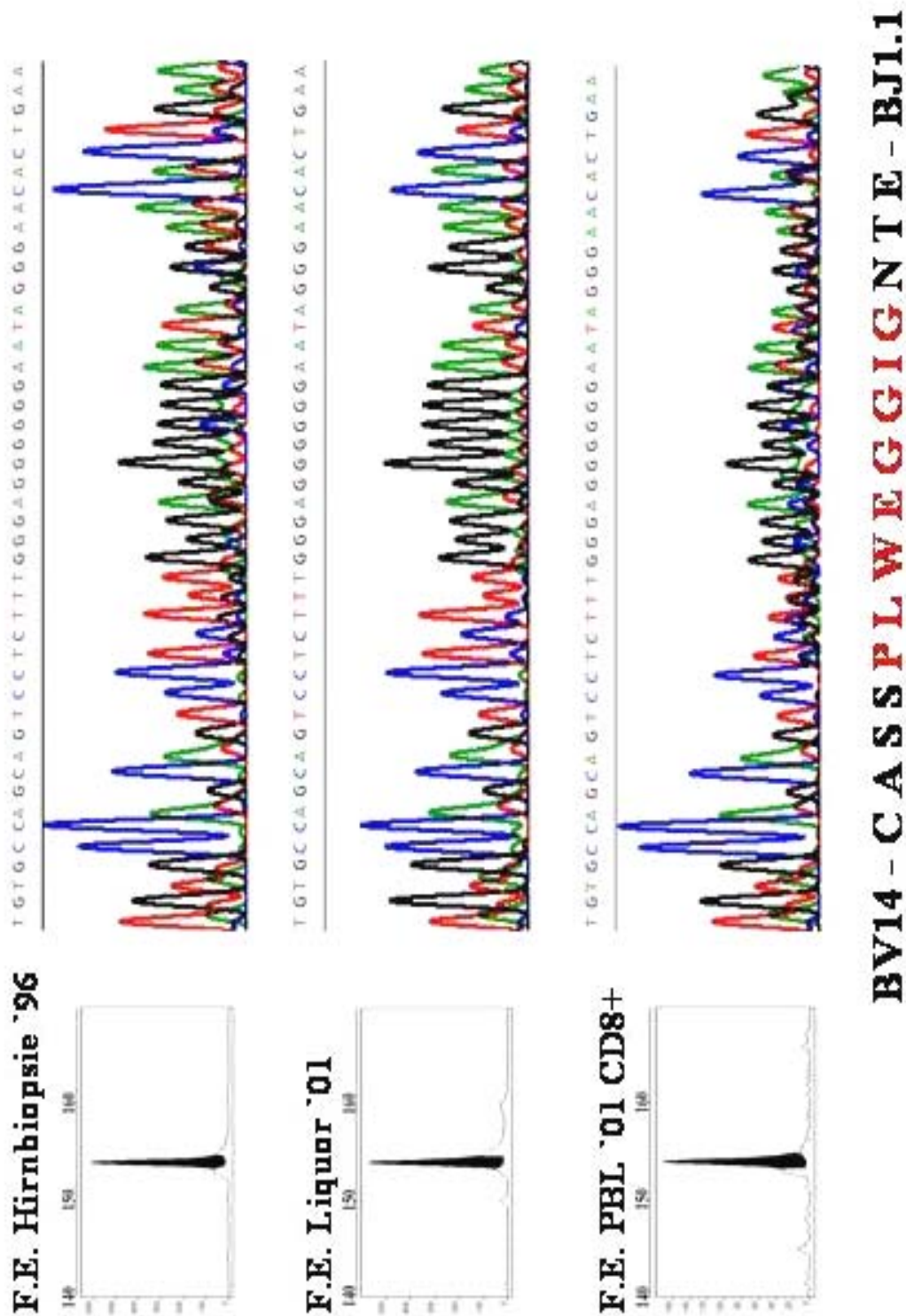


Abbildung 8: CDR3-Spektrotyping am Beispiel eines in Hirngewebe, Liquor und CD8+ T-Lymphozyten des peripheren Blutes von MS-Patienten F.E. identischen expandierten T-Zell-Klones BV14-BJ1.1. Daneben jeweils die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3-Region (β -Kette)

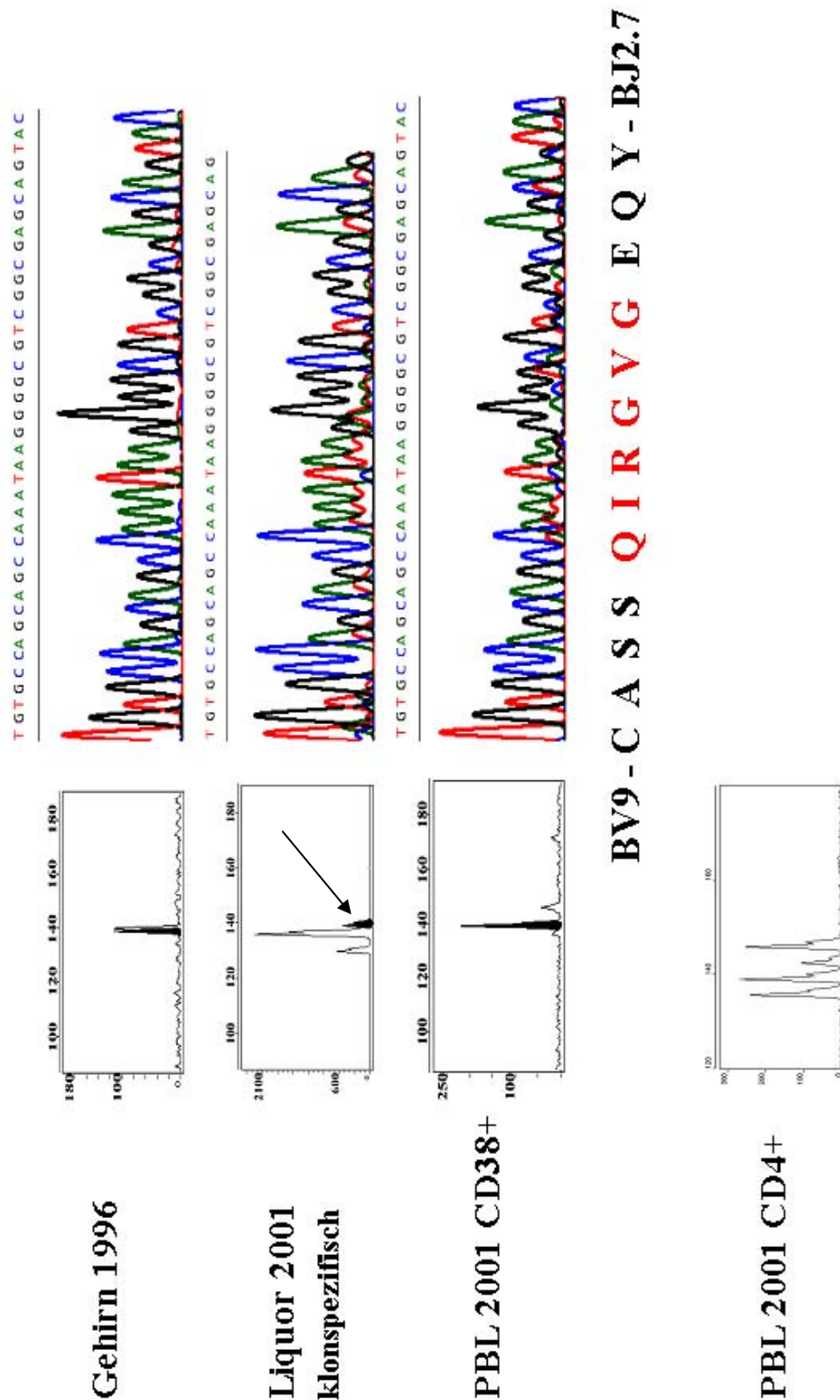


Abbildung 9: CDR3-Spektratyping am Beispiel des in Hirngewebe, Liquor und CD38+ T-Zellen des peripheren Blutes von MS-Patienten F.E. identischen expandierten T-Zell-Klones BV9-BJ2.7. Daneben jeweils die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3-Region (β -Kette)

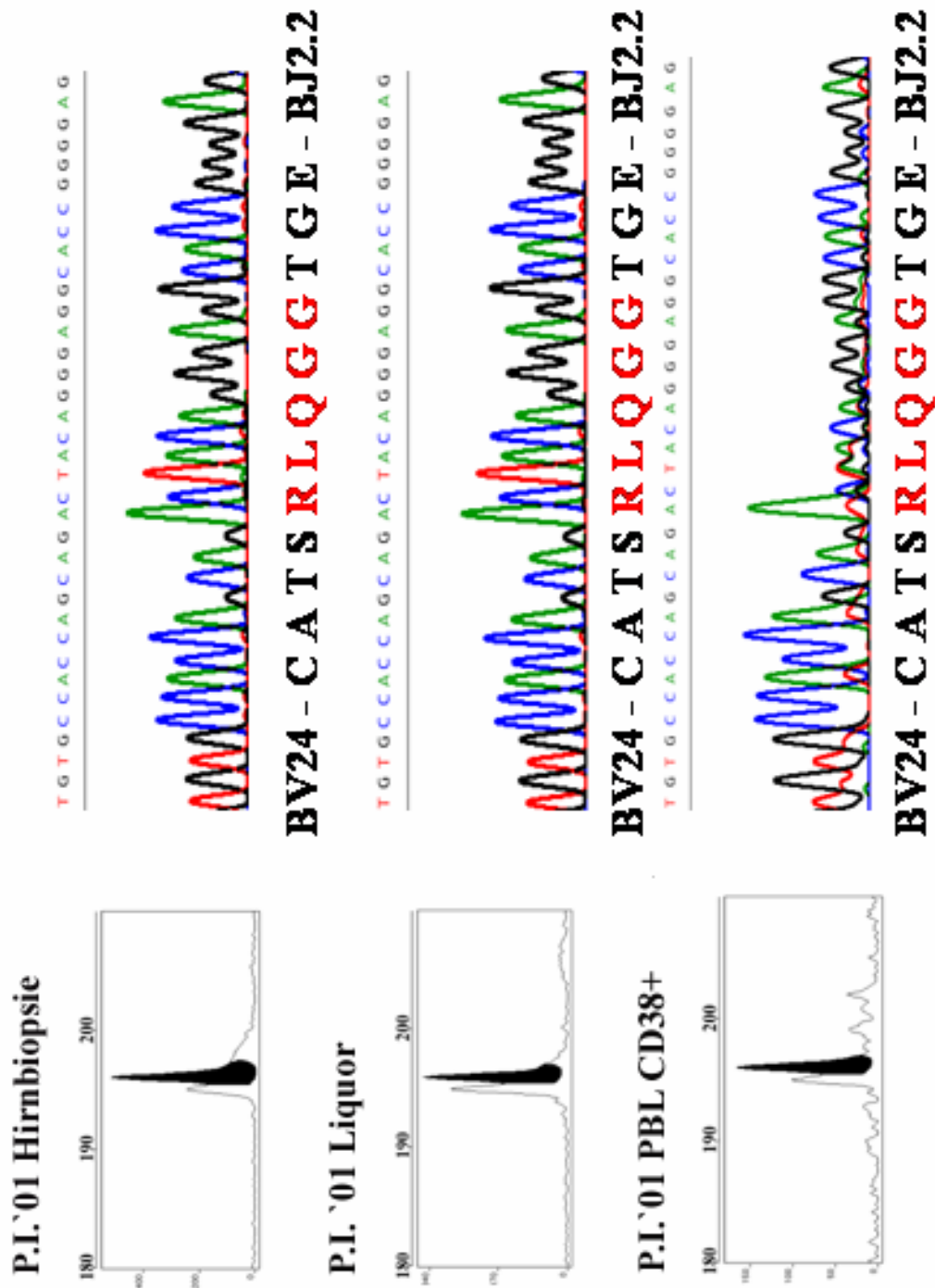


Abbildung 10: CDR3-Spektratyping am Beispiel des in Hirngewebe, Liquor und CD38+ T-Zellen des peripheren Blutes von MS-Patienten P.I. identischen expandierten T-Zell-Klonen BV24-BV2.2. Daneben jeweils die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3-Region (β -Kette)

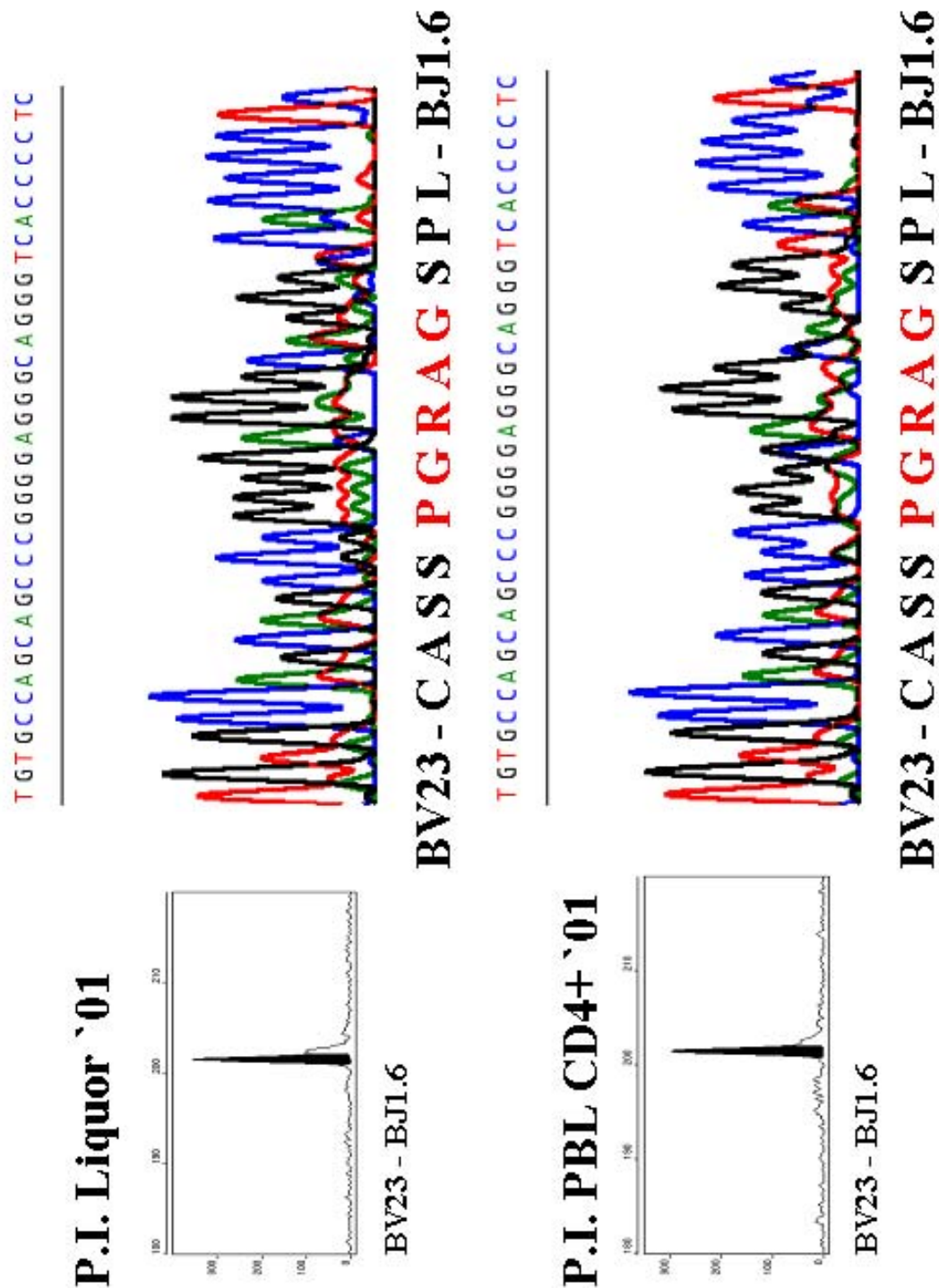


Abbildung 11: CDR3-Spektrotyping am Beispiel eines in Liquor und CD4+ T-Zellen des peripheren Blutes von MS-Patienten P.I. identischen expandierten T-Zell-Klones BV23-1.6. Daneben jeweils die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3-Region (β -Kette).

IV.2 Vergleichende Analyse des T-Zell Repertoires von Liquor und PBL-Fraktionen durch CDR3-Spektratyping bei zusätzlichen MS-Patienten:

IV.2.1 VERGLEICH DES T-ZELL REPERTOIRES VON LIQUOR UND PERIPHEREM BLUT BEI PATIENTEN MIT SCHUBFÖRMIGER MULTIPLER SKLEROSE

Bei Patienten mit schubförmiger MS waren während des Schubes identische expandierte T-Zell-Klone im Liquor und in der Fraktion aktivierter (CD25+ oder CD38+) T-Lymphozyten im peripheren Blut nachweisbar.

Bei **Patientin F.O.**, die unter einer klinisch gesicherten, schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose leidet, konnten die Sequenzen BV4-C S-V R P L S S G-A N V-BJ2.6 und BV24-C A T S-Q G T G F-T G E-BJ2.2 während eines klinischen Schubes im aktivierten CD25+ Kompartiment des peripheren Blutes und im Liquor detektiert werden (Abb.12).

Beim **Patienten D.J.**, der ebenfalls unter einer schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose leidet, fanden wir den expandierten Klon BV15-C A T S-G V F R D T H P-T E A-BJ1.1 während eines klinischen Schubes im aktivierten CD25+ Kompartiment des peripheren Blutes und im Liquor.

Beim **Patienten H.K.** konnten wir die Sequenz BV15-C A T S V G Q A S S Y N-BJ2.1 im Liquor von 1995 und bei den CD8+ Blutzellen von 1992 identifizieren (Abb. 13). Der Klon mit der Sequenz BV13.1-C A S S-E N G D P R-T Q Y-BJ2.5 fand sich im Liquor von 1995, bei den CD4+ Blutzellen von 1992 während der Remission und in diversen aktivierten Subpopulationen des peripheren Blutes (CD25+, CD26+ und CD38+) von 1999 während eines Schubes.

Der im Liquor von 1995 bis 1999 persistierende Klon BV16-C A S S-Q P A W A-G E L-BJ2.2 war während eines Schubes, nicht aber während der Remission in der Fraktion der aktivierten T-Zellen im peripheren Blut nachweisbar. Er war zusätzlich in der CD4+ Fraktion des peripheren Blutes von 1992 während der Remission zu finden (Abb.14).

Als Kontrollpersonen analysierten wir MS-Patienten B.E., bei dem Liquor und peripheres Blut während der Remission entnommen wurden, Patientin B.H., die unter einem Pseudotumor cerebri litt, sowie Patientin H.A., die an einer akuten Herpes-

Enzephalitis litt. Bei den Patienten B.E. und B.H. konnten wir keine übereinstimmenden Sequenzen in Liquor und aktiviertem Kompartiment des peripheren Blutes finden. Bei Patientin H.A. identifizierten wir eine in Liquor und aktiviertem Kompartiment (CD38+) des peripheren Blutes übereinstimmende Sequenz (Abb. 15).

IV.2.2 PERSISTENZ EXPANDIERTER T-ZELL KLONE IM LIQUOR VON MS-PATIENTEN

Im Rahmen dieser Dissertation konnte durch die systematische Analyse des T-Zell Repertoires des Liquors von Patienten mit schubförmig verlaufender Multipler Sklerose weiter gezeigt werden, dass klonal expandierte T-Lymphozyten über bis zu 4 Jahre im Liquor persistieren. Sämtliche Liquores wurden während eines Schubes entnommen.

So fanden sich bei **Patient H.K.** die Sequenzen BV2–C S A R–**S G G R Y**–I Q Y–BJ2.4, BV7–C A S S –**Q D G G V R**–E K L –BJ1.4, BV16–C A S S–**Q P A W A**–G E L–BJ2.2 (Abb.14), BV23–C A R S–**L R D R Y D**–Q Y F–BJ2.7 sowohl im Liquor von 1995 als auch von 1999.

Bei **Patientin G.O.** identifizierten wir die Sequenzen BV20–C A W S–**T P Q G A A G Y L T D**–T Q Y–BJ2.3, BV5.1–C A S D–**W T D S N Q**–P Q H–BJ1.5, BV19–C A S S–**L Y G S M N T**–E A F–BJ1.1, BV14–C A S S–**I Q G A N Y**–G Y T–BJ1.2 im Liquor von 1998 und 2000 (Abb.16).

Bei **Patientin K.L.** persistierten im Liquor von 1996 bis 1999 die T-Zell Klone mit den Sequenzen BV14–C A S S–**L G T G A T**–G E L–BJ1.1, BV6–C A S S–**P S D S A K N**–I Q Y–BJ2.4, BV8–C A S S–**S G H**–E Q Y–BJ2.7, BV17–C A S S–**R T S G S L**–E T Q–BJ2.5, BV15–C A T S–**G G Q G V E T**–E A F–BJ1.1 (Abb.17).

Beim **Patienten N.E.** fand sich die Sequenz BV19–C A S R–**K T S G S Y N**–E Q F–BJ2.1 im Liquor von 1997 und 1998.

Tabelle III zeigt eine Übersicht aller mit CDR3-Spektratyping analysierten Patienten und die entsprechenden Sequenzen der CDR3-Region.

Tabelle IV gibt eine Übersicht aller im Rahmen dieser Dissertation untersuchter Patienten mit Geburtsjahr und untersuchten Subfraktionen.

MS-Patienten:

- **H.K.:**
 - Liquor 1995, PBL: CD8+ 1992
BV15 – C A T S **V G Q A S S Y N** – BJ2.1

 - Liquor 1995, PBL 1999 (Schub): CD25+/26+/38+ 1999 , CD4+ 1992, CD4+ 1997
BV13.1 – C A S S – **E N G D P R** – T Q Y - BJ2.5

 - Liquor 1995, Liquor 1999 (jeweils Schub):
BV2 – C S A R – **S G G R Y** – I Q Y – BJ2.4
BV7 – C A S S – **Q D G G V R** – E K L – BJ1.4
BV16 – C A S S – **Q P A W A** – G E L – BJ2.2
BV23 – C A R S – **L R D R Y D** – Q Y F - BJ2.7

 - Liquor 1995, Liquor 1999; PBL 1992: CD4+; PBL 1999 (Schub): CD25+/CD38+ T-Zellen
BV16 – C A S S – **Q P A W A** – G E L – BJ2.2

- **K.L.:**
 - Liquor 1996, Liquor 1999 (Schub)
BV14 – C A S S – **L G T G A T** – G E L – BJ1.1
BV6 – C A S S - **P S D S A K N** – I Q Y – BJ2.4
BV8 – C A S S – **S G H** – E Q Y – BJ2.7
BV17 – C A S S – **R T S G S L** – E T Q – BJ2.5
BV15 – C A T S – **G G Q G V E T** – E A F – BJ1.1

- **N.E.:**
 - Liquor 1997, Liquor 1998 (Schub)
BV19 – C A S R – **K T S G S Y N** – E Q F – BJ2.1

- **G.O.:**
 - Liquor 1998, Liquor 2000 (Schub)
BV20 – C A W S – **T P Q G A A G Y L T D** – T Q Y – BJ2.3
BV5.1 – C A S D – **W T D S N Q** – P Q H – BJ1.5
BV19 – C A S S – **L Y G S M N T** – E A F – BJ1.1
BV14 – C A S S – **I Q G A N Y** – G Y T – BJ1.2

- **F.O.:**
 - Liquor 1999, PBL 1999 (Schub): CD25+
BV4 – C S – **V R P L S S G** – A N V – BJ2.6
BV24 – C A T S – **Q G T G F** – T G E – BJ2.2

- **D.J.:**
 - Liquor 1999, PBL 1999 (Schub): CD25+
BV15 – C A T S – **G V F R D T H P** – T E A – BJ1.1

Kontrollpatienten:

- **H. A. (virale Enzephalitis)**
 - Liquor 1998, PBL: CD38+ T-Zellen 1998
BV20 – C A – **W G L A R** – N T E – BJ1.1
- **B.E. (MS, Remission)**
 - Ø
- **B.H. (Pseudotumor cerebri)**
 - Ø

Table III: Übersicht über expandierte T-Zell-Klone im Liquor und in Subfraktionen aus dem peripheren Blut von MS-Patienten und Kontrollpersonen. Angegeben ist jeweils die BV-BJ Zugehörigkeit und die Aminosäuresequenz der CDR3 Region.

Tabelle IV:

KÜRZEL	DIAGNOSE	GEB.	GESCHL.	UNTERSUCHTE SUBFRAKTIONEN	ZEITPUNKTE
H.K.	RR-MS	1963	M	CD4+ PBL CD8+ PBL CD25+/26+/38+ PBL Liquor- T-Zellen	'92, '97, '99 '92, '97 '99 '95, '99
K.L.	RR-MS	1967	W	Liquor- T-Zellen	'96, '99
N.E.	RR-MS	1970	M	Liquor- T-Zellen	'97, '98
G.O.	RR-MS	1956	M	Liquor- T-Zellen	'98, '00
F.O.	RR-MS	1956	W	CD25+ PBL Liquor- T-Zellen	'99 '99
D.J.	RR-MS	1974	M	CD25+ PBL Liquor- T-Zellen	'97 '97
F.E.	RR-MS	1947	M	CD4+/8+/38+ PBL Liquor T-Zellen Hirngewebe	'01 '96
P.I.	RR-MS	1969	W	CD4+/8+/38+ PBL Liquor T-Zellen Hirngewebe	12'01 11'01 05'01
B.E.	RR-MS (Remission)	1971	M	CD38+ PBL Liquor- T-Zellen	'98 '98
H.A.	Virale Enzephalitis	1928	W	CD25+ PBL Liquor- T-Zellen	'98 '98

Tabelle IV: Übersicht über alle untersuchten Patienten mit Angabe der untersuchten Kompartimente und T-Zell Subfraktionen.

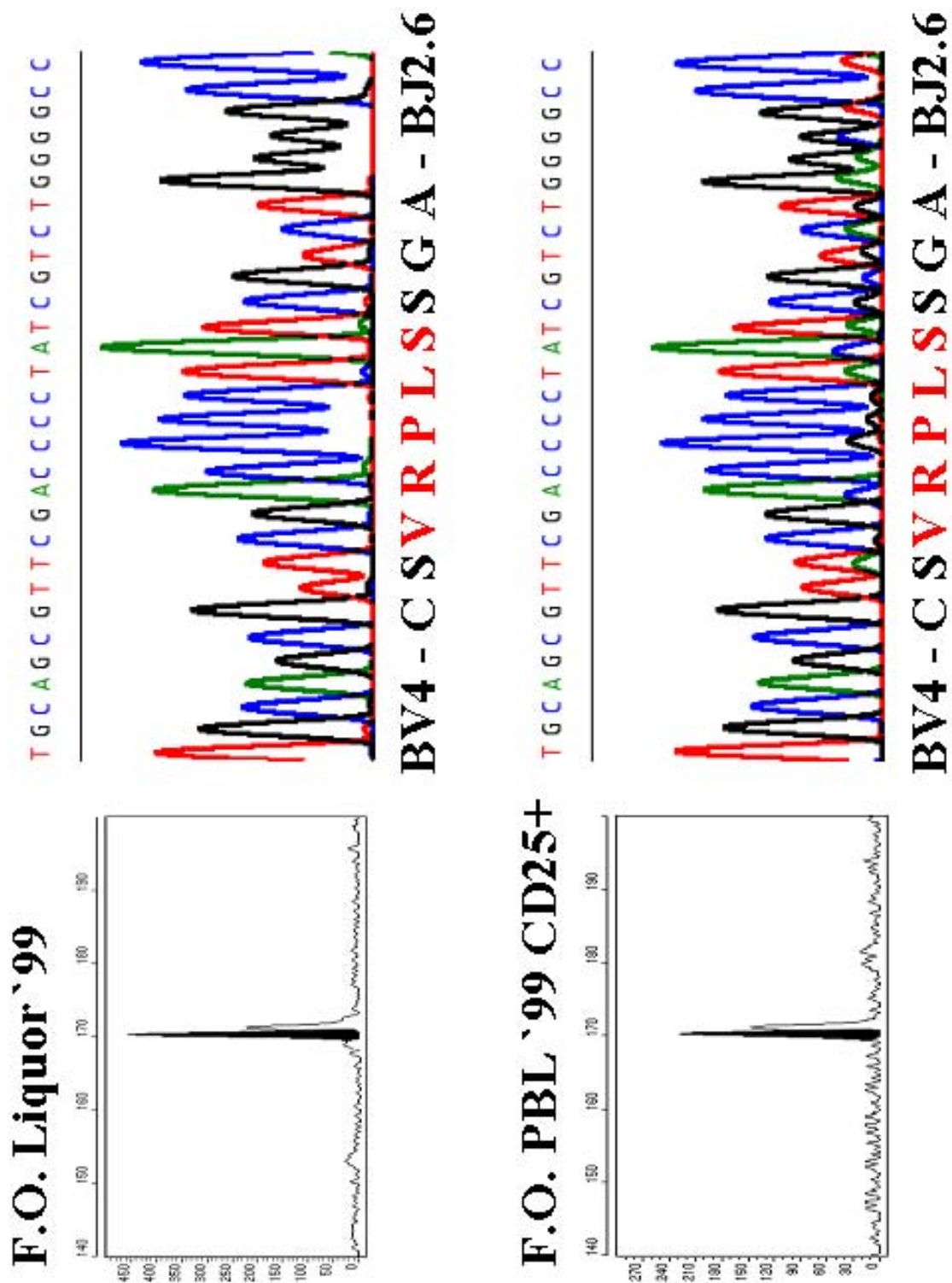


Abbildung 12: CDR3-Spektratyping am Beispiel des im Liquor und in der CD25+ Fraktion des peripheren Blutes von MS-Patienten F.O. identischen expandierten T-Zell-Klones BV4-BJ2.6. Blut und Liquor wurden dem Patienten während eines klinischen Schubes entnommen. Daneben jeweils die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3-Region. (β-Kette)

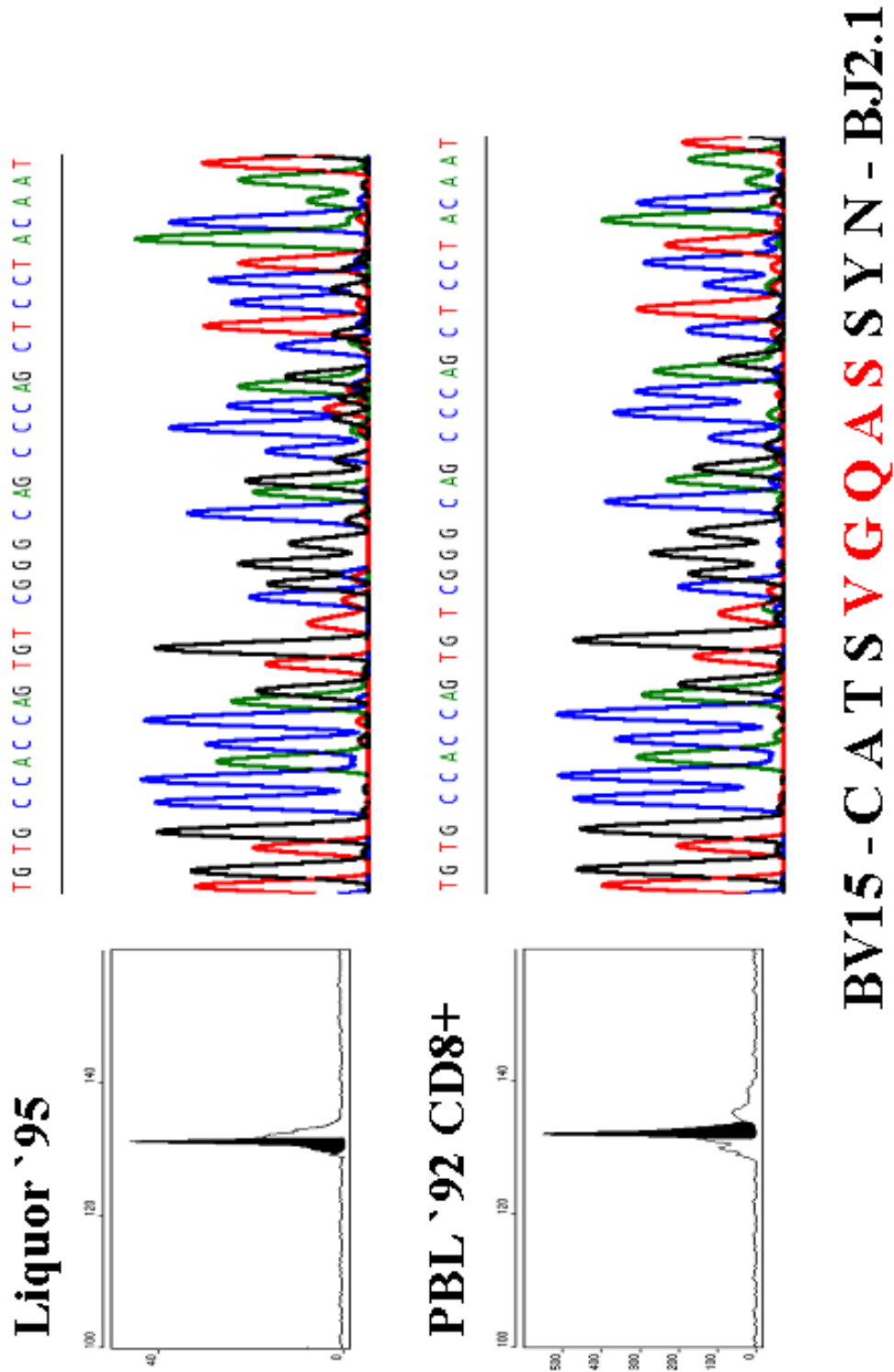
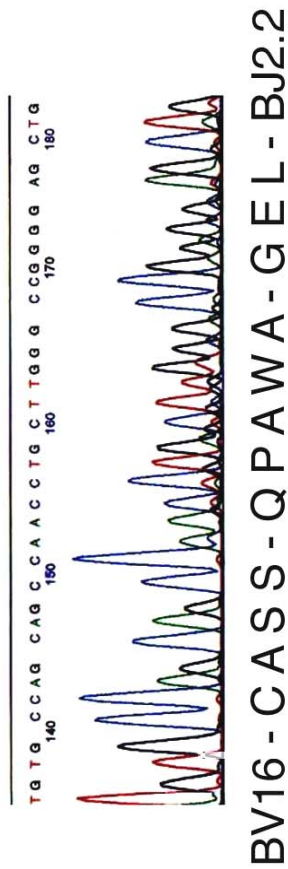
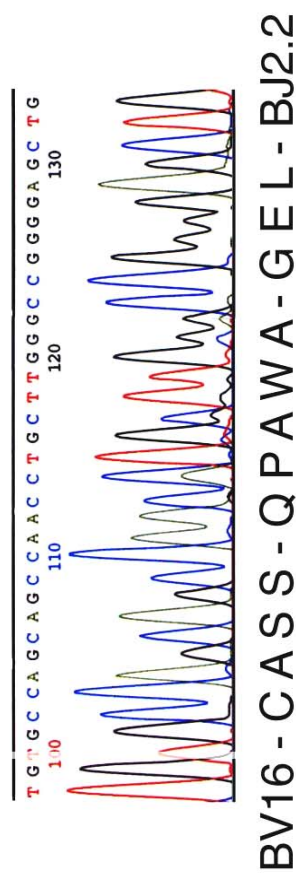


Abbildung 13: CDR3-Spektratyping am Beispiel eines im Liquor und in der CD8+ Fraktion des peripheren Blutes identischen expandierten T-Zell-Klones BV15-BJ2.1 von MS- Patienten H.K., jeweils während eines klinischen MS-Schubes 1992 bzw. 1995. Daneben die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3-Region (β -Kette).

CD25+ PBL, 1999a: Schub



Liquor 1995 und 1999



CD25+ PBL, 1999b: Remission

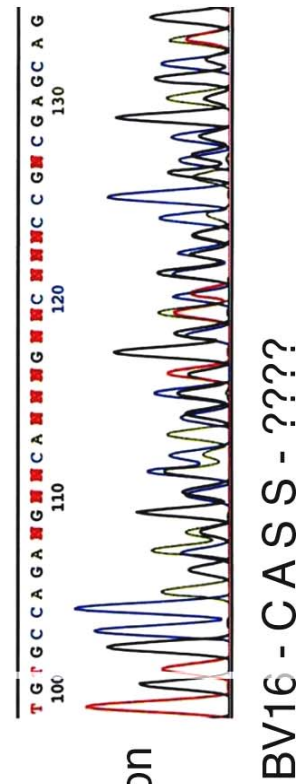


Abbildung 14: Der im Liquor von MS-Patienten H.K. persistierende T-Zell-Klon BV16 – BJ2.2 ist während des Schubes, nicht aber während der Remission auch in der Fraktion der aktivierten, CD25+ T-Zellen im peripheren Blut als expandiert nachweisbar.

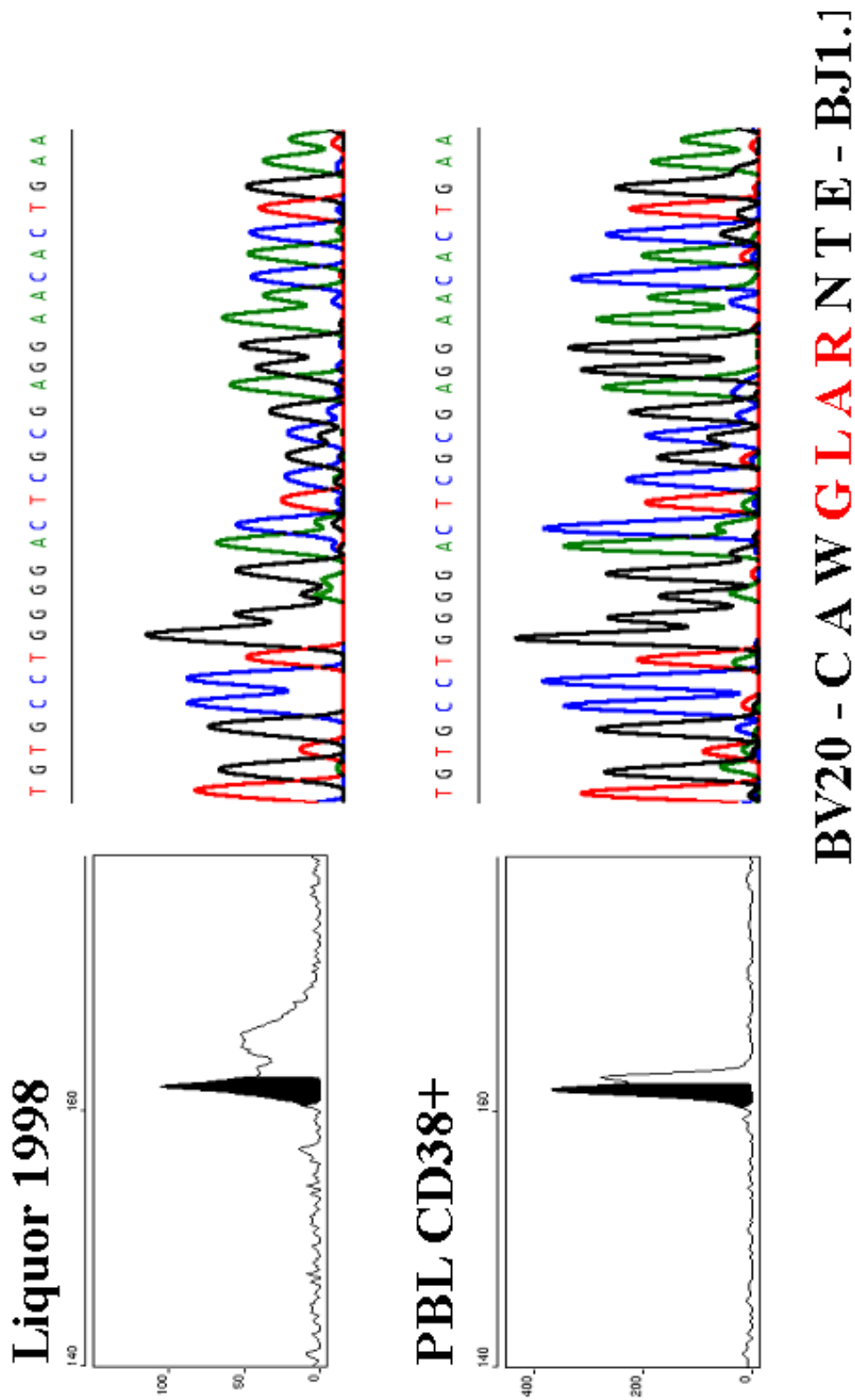


Abbildung 15: CDR3-Spektrotyping am Beispiel eines im Liquor und in der CD25+ Fraktion des peripheren Blutes von **Patientin H.A.** identischen expandierten T-Zell-Klones BV20-BJI.1. Die Patientin erkrankte an einer akuten Herpes-Enzephalitis. Daneben jeweils die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3-Region (β -Kette).

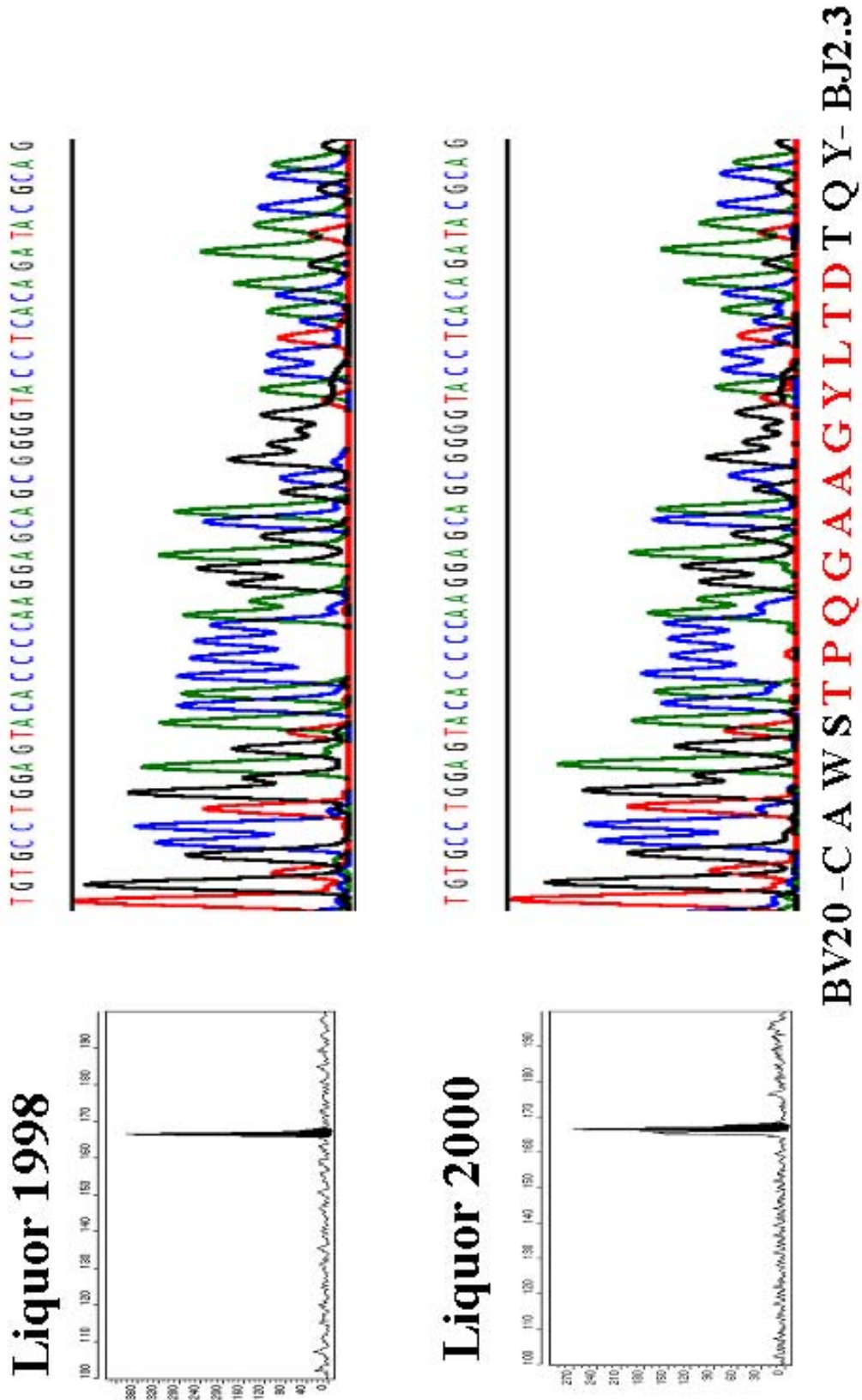


Abbildung 16: CDR3-Spekttratyping am Beispiel des im Liquor von MS-Patienten G.O. über zwei Jahre persistierenden, expandierten T-Zell-Klones BV20-BJ2.3. Daneben jeweils die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3-Region (β -Kette).

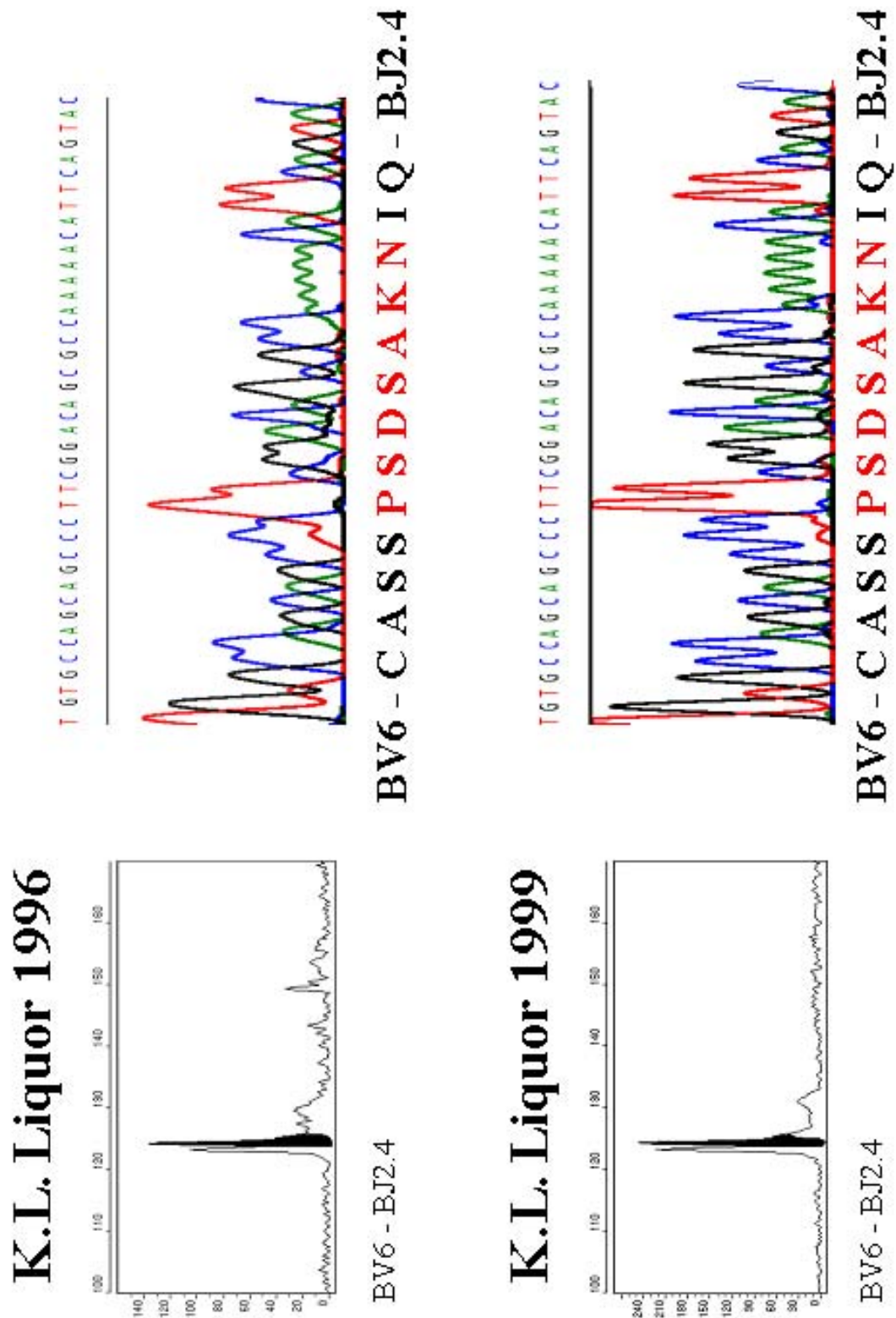


Abbildung 17: CDR3-Spektrotyping am Beispiel des im Liquor von MS-Patienten K.L. über zwei Jahre persistierenden, expandierten T-Zell-Klones BV6-BJ2.4. Daneben jeweils die Nucleotid- und Aminosäuresequenz der CDR3-Region (β -Kette).

V DISKUSSION

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit Hilfe des CDR3-Spektratypings das T-Zell Repertoire von MS-Läsionen des Gehirns, von Liquor und verschiedenen Subfraktionen des peripheren Blutes zweier noch lebender MS Patienten systematisch zu untersuchen.

Im Falle von Patient F.E. konnten wir die mittels CDR3-Spektratyping erhaltenen Sequenzen mit Sequenzen vergleichen, die von Babbe et al. auf Einzelzellebene bei dem selben Patienten identifiziert wurden; mittels hydraulischer Mikromanipulation wurden einzelne Zellen direkt aus der Hirnläsion (parenchymal) bzw. aus perivaskulärem Hirngewebe isoliert und die CDR3 Region des T-Zell Rezeptors sequenziert. Es konnte gezeigt werden, dass in aktiv demyelinisierenden MS-Läsionen die CD8⁺ T-Zell-Population aus klonal expandierten T-Zellen besteht, während die CD4⁺ T-Zell Population eine deutlich polyklonaler Zusammensetzung hat. Zusätzlich war die Zahl der identifizierten CD8⁺ T-Zellen in MS-Läsionen um den Faktor 5-6 größer als die der CD4⁺ T-Lymphozyten (Babbe et al, 2000). Einige frühere Untersuchungen zur Zusammensetzung des T-Zell-Repertoires in MS-Hirngewebe ergaben unterschiedliche Ergebnisse: Analysen von revers-transkribierter mRNA aus MS-Hirngewebe mit V-Familien-spezifischer PCR ergab zum Teil Hinweise auf eine polyklonale Zusammensetzung der ZNS-Infiltrate (Wucherpfennig et al., 1992), andere Autoren fanden ein restringiertes T-Zell-Repertoire in den MS-Läsionen (Oksenberg et al., 1990; Birnbaum & Van Ness, 1992; Oksenberg et al., 1993)

Mittels CDR3-Spektratyping konnten wir mit einer Ausnahme alle auf Einzelzellebene isolierten expandierten CD8⁺ T-Zell Klone im Gehirn bestätigen. Dadurch schlossen wir aus, dass es sich bei den von uns identifizierte T-Zell Klonen um eine bloße Kontamination mit Blut-Lymphozyten handelte. Zusätzlich konnten wir Sequenzen identifizieren, die nicht mittels Einzelzellanalyse gefunden wurden.

5 Jahre später waren viele dieser potentiell autoaggressiven T-Zell Klone im Liquor und in der CD8⁺ und CD38⁺ Subpopulation des peripheren Blutes zu detektieren. Keine fand sich unter den CD4⁺ Blutzellen.

Durch die systematische Analyse des T-Zell Repertoires von peripherem Blut und Liquor von 6 weiteren MS-Patienten konnten wir zudem zeigen, dass während eines Schubes expandierte und aktivierte (CD25+/CD38+) T-Zell Klone aus dem peripheren Blut in den Liquor übertreten können und dort über viele Jahre persistieren können.

Es stellt sich jetzt die Frage der funktionellen Bedeutung dieser expandierten, z.T. über Jahre persistierenden T-Zell Klone, die sich in MS-Läsionen, Liquor und peripherem Blut von MS-Patienten finden.

CD4+ und CD8+ T-Zellen könnten in die pathogenetische Immunantwort gegen Autoantigene des Gehirn involviert sein und könnten den Schaden an den Oligodendrozyten durch direkte Zytolyse oder durch Sekretion von Zytokinen verursachen. Im Laufe dieses initialen pathologischen Prozesses können Gene im Gehirn aktiviert werden, die das bei Gesunden immunologisch stumme Hirngewebe in ein Milieu verwandeln, das Entzündung zulässt und das zur Antigen-spezifischen Immunantwort befähigt ist (Neumann, 2001). Mikroglia-Zellen werden aktiviert und erwerben phagozytotische und Antigen-präsentierende Fähigkeiten (Dickson et al., 1991; Fontana et al., 1992). Durch diese Aktivierung bekommen Astrozyten und Mikroglia-Zellen die Fähigkeit, Antigene über MHC Klasse I und II zu präsentieren-häufig ist zusätzlich die Blut-Hirn-Schranke gestört. In Folge dessen könnten invadierende T-Lymphozyten antigenes Material erkennen und als potente Immun-Effektor-Zellen agieren. Bei der MS kann eine sehr ausgeprägte Immunaktivität beobachtet werden (Noseworthy et al., 2000).

Das pathogene Potential von myelin-spezifischen CD4+ T-Lymphozyten ist in Tiermodellen von demyelinisierenden Erkrankungen gut etabliert (Weckerle et al., 1994; Lassmann et al., 1991). Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) war eines der wichtigsten Modelle für Autoimmunität und gewährte Einblicke in viele Mechanismen während physiologischer und pathologischer Immunantworten (Zamvil et al., 1990). Die klassische EAE wird bei empfänglichen Tierrassen, z.B. der Lewis-Ratte, durch Immunisierung mit Myelin-Antigenen und Freud's Adjuvant ausgelöst. Die Krankheit verläuft normalerweise monophasisch mit spontaner Remission. Die EAE wurde in den letzten 20 Jahren extensiv charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass die Krankheit durch CD4+ Myelin-spezifische T-Zellen übertragen werden kann. Obwohl nur eine Minderheit dieser Myelin-spezifischen T-Zell Klone EAE übertragen kann, dachte man lange, dass diese Zellen zur Gruppe der Typ I Helferzellen gehören, die durch die Sekretion von IL-2, IFN- γ und TNF- α

charakterisiert sind. Die Sekretion von TNF- α , einem proinflammatorischen Zytokin, wurde als entscheidend hinsichtlich Enzephalogenität von T-Zell Klonen angesehen (Zamvil et al., 1990).

Auf der anderen Seite führte die Blockade von TNF- α und die Polarisierung der T-Zell Antwort in Richtung eine Typ II T-Helfer-Zell Phänotyps (Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13) zu einer Besserung des Krankheitsverlaufes bei den meisten EAE-Modellen. Das EAE Konzept wurde auf die Krankheit des Menschen übertragen und die MS als eine Krankheit klassifiziert, die in erster Linie durch Typ I T-Helfer-Zellen ausgelöst wird und bei der TNF- α eine zentrale Rolle spielt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten expandierte, z.T. über bis zu 4 Jahre persistierende, CD4+ T-Zell Klone im Liquor von MS-Patienten nachgewiesen werden.

In einer Reihe von Studien wurde kürzlich gezeigt, dass dieses Paradigma bei der EAE und besonders bei der MS zu stark vereinfacht ist. Z.B. entwickelten in einer Studie IFN- γ "Knockout-Mäuse" schwerere EAE als Wildtyp-Mäuse (Owens et al., 2001). Die Ergebnisse von genetischen Modellen mit veränderter TNF- α Expression waren heterogener. Die Überexpression von TNF- α im ZNS resultierte meist in einer spontanen Demyelinisierung oder in einem schwereren Krankheitsverlauf der EAE. Abhängig vom genetischen Hintergrund der Tiere, führte das Ausschalten des TNF- α Gens zu unterschiedlicher Empfänglichkeit und Schwere der Erkrankung; die EAE konnte jedoch in allen diesen Knockout-Modellen induziert werden (Owens et al., 2001; Steinman, 1997). In anderen Studien wurden Enzephalitiden durch Typ 0 T-Helfer-Zellen ausgelöst, die sowohl Zytokine von Typ I als auch von Typ II T-Helfer-Zellen produzieren können (Brocke et al., 1996).

Die Möglichkeit, EAE mit Typ II T-Helfer-Zellen zu induzieren, wurde an einem transgenen Mausmodell gezeigt. In diesem Tiermodell wurde die Krankheit durch den Transfer einer großen Anzahl von Typ II T-Helferzellen in immunsupprimierte Mäuse induziert (Lafaille et al., 1997). Auch die meisten therapeutischen Ansätze zur Immunintervention beim Menschen haben sich darauf konzentriert, CD4+ myelin-spezifische T-Zellen zu unterdrücken, die Immunantwort in Richtung eines Typ II T-Helfer-Zell Phänotyps zu verschieben oder TNF- α Signal-Transduktionsweg zu blockieren. Obwohl diese Strategien im klassischen EAE-Modell sehr effizient waren, waren die Meisten beim Menschen wirkungslos oder haben den Verlauf der MS sogar verschlechtert (Hohlfeld et al., 2001; Martin et al., 2001).

Zusätzliche Aspekte ergaben sich aus kürzlich durchgeführten Studien über die Rolle von CD8⁺ T-Zellen bei der MS und der EAE. Der frühe Verlust von Oligodendrozyten und Neuronen konnte schon immer schwer durch CD4⁺ Typ I T-Helfer-Zellen erklärt werden, da Oligodendrozyten und Astrozyten nur MHC Klasse I exprimieren und somit nicht in der Lage sind, CD4⁺ T-Zellen Antigen zu präsentieren. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Mikroglia-Zellen, die einzigen Zellen, die im ZNS MHC Klasse II exprimieren, den CD4⁺ T-Zellen Myelin-Antigene präsentieren könnten und es über weitere Mechanismen (z.B. TNF- α) zur Schädigung von Oligodendrozyten und Astrozyten kommen könnte. Es liegt jedoch näher, dass T-Zellen, die Antigen über MHC Klasse I erkennen, eine gewichtige Rolle in der Pathogenese der MS spielen (Redwine et al., 2001). Tatsächlich können CD8⁺ T-Zellen Oligodendrozyten und Neurone schädigen (Jurewicz et al., 1998; Medana et al., 2000). Darüber hinaus wurde in einem in vitro Modell gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen MHC Klasse I exprimierende Axone antigen-spezifisch attackieren, wodurch es zu Schädigungen kommt, die denen der MS in MS Hirnläsionen ähnlich sind (Medana et al., 2001). Diese Beobachtung ist besonders in Zusammenhang mit der hier vorliegenden Dissertation und zwei Arbeiten interessant, die die Rolle der CD8⁺ T-Zellen in MS-Hirnläsionen und dem Liquor untersuchen. Auf die Arbeit von Babbe et al., die auf Einzelzelleben zeigte, dass die klonalen Expansionen in MS-Läsionen vorwiegend aus CD8⁺ T-Zellen bestehen, wurde weiter oben bereits hingewiesen (Babbe et al., 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation erbrachten neue Hinweise für die große pathogenetische Relevanz der CD8⁺ T-Zellen: Erstens fanden sich einige expandierte CD8⁺ T-Zell Klone in den MS-Läsionen und auch im Liquor und im Blut. Zweitens waren die übereinstimmenden Klone (Hirn-Liquor-Blut) nur in der CD8⁺ Population, nicht aber in der CD4⁺. Drittens wurden einige der CD8⁺ T-Zell Klone, die im Gehirn identifiziert wurden, auch in der CD38⁺ Subpopulation des Blutes detektiert, d.h. sie waren zum Zeitpunkt der Probeentnahme aktiviert. Schließlich persistierten einige der das Gehirn infiltrierenden CD8⁺ T-Zell Klonen über viele Jahre in Liquor und Blut; dies spricht für eine sehr ausgeprägte Gedächtnis-Immunantwort und/oder eine ständige Exposition gegenüber einem unbekanntem Antigen. All diese Punkte deuten auf die pathogenetische Bedeutung dieser CD8⁺ T-Zell Klone hin; sie könnten regulierende Funktionen haben oder als zytotoxische Effektorzellen agieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass MS-Läsionen CD8⁺ T-Zellen enthalten, die Neurone und Axone, die MHC Klasse I exprimieren, attackieren können (Neumann et al., 2002)

Da Liquor und peripheres Blut die einzigen realistischerweise für weitere immunologische Untersuchungen zugänglichen Kompartimente sind, sind diese Erkenntnisse von großer Bedeutung für die zukünftige MS-Forschung. Durch die vorliegende Arbeit wurde zudem ein Bogen gespannt zu der Studie von Jacobson et al., in der das T-Zell Repertoire im Liquor von 36 MS-Patienten untersucht wurde, und eine spezifische klonale Anhäufung von CD8⁺ T-Zellen im Liquor von MS-Patienten gefunden wurde (Jacobson et al., 2002). Wir konnten bei 4 MS-Patienten die Langzeitpersistenz von expandierten T-Lymphozyten im Liquor zeigen. Die Antigenpezifität dieser Zellen ist jedoch nicht bekannt. Die Tatsache, dass sie im ZNS spezifisch angereichert und dort über viele Jahre persistent sind, spricht dafür, dass sie durch im Gehirn sitzende Zielantigene stimuliert werden.

Kürzlich konnte in einer Studie von Sun et al. durch aufgereinigte myelin-spezifische CD8⁺ T-Zell Klone eine progressive und destruktive EAE im Tiermodell ausgelöst werden (Sun et al., 2001). Husby et al. induzierten eine EAE durch CD8⁺ T-Zell Klone, die spezifisch gegen ein Peptid des Myelin-Basischen-Proteins (MBP) gerichtet sind. In diesem Modell waren die Läsionen vor allem im Gehirn lokalisiert und nicht im Rückenmark, wie es bei den Meisten, durch CD4⁺ T-Zell Klone ausgelösten EAE der Fall ist (Huseby et al., 2001).

Zusätzlich zu pathogenen autoreaktiven T-Zellen können MS-Läsionen auch T-Zellen enthalten, die der Gewebszerstörung entgegenwirken (Kerschensteiner et al., 1999). Bei der EAE wurden die Effekte sowohl von CD4⁺ als auch CD8⁺ regulatorischen T-Zellen beschrieben (Sun et al., 1988; Jiang et al., 1992; Koh et al., 1992; Van de Keere & Tonegawa, 1998; Olivares-Villagómez et al., 1998).

Zusätzlich zu autoreaktiven und regulatorischen T-Zell Klonen könnten sich auch Klone, die primär nichts mit dem Autoimmunprozess zu tun haben, in Hirnläsionen und im Liquor befinden. Aktivierte T-Zellen haben die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und könnten sich so unabhängig von ihrer Antigenpezifität an Stellen ansammeln, an denen eine Entzündung abläuft (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991).

Zusammenfassend konnten wir mit CDR3-Spektratyping das T-Zell Repertoire von Gehirn, Liquor und Blut systematische vergleichen. Unsere Ergebnisse liefern zum allerersten Mal den experimentellen Beweis auf wissenschaftlicher Grundlage, dass die Zellen des Liquors zumindest teilweise das Immun-Repertoire des Gehirn in der

Multiplen Sklerose repräsentieren. Diese Arbeit hat direkte Relevanz für zukünftige Arbeiten an der Immun-Pathogenese des MS, da Liquor -im Gegensatz zu Hirngewebe- für wissenschaftliche Studien leicht verfügbar ist. Unsere Ergebnisse zeigen weiter, dass ein Teil dieser CD8+ T-Zell Klone, die das Gehirn von MS-Patienten infiltrieren, auch im Blut nachweisbar sind. Diese T-Zell könnten in Zukunft hinsichtlich der Beurteilung von Krankheitaktivität und Behandlungserfolg nützlich sein. Sie könnten aus dem Blut oder dem Liquor in größerer Zellzahl isoliert werden, geklont werden und mit einer großen Anzahl möglicher Kandidatenantigene, z.B. mittels „Peptid-libraries“ (Hemmer et al.; 1998), getestet werden. Dies bietet eine realistische Chance, die Antigen-Spezifität und die Krankheitsrelevanz dieser T-Zell Klone näher zu beleuchten und somit die Entwicklung antigenspezifischer Immuntherapeutika zu ermöglichen.

VI LITERATURANGABEN

1. Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt, S., Ravid, R. und 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.* 192(3) (2000) 393-404.
2. Bashir, K. und Whitaker, J.N.: Current immunotherapy in multiple sclerosis. *Immunol.Cell Biol.* 76 (1998) 55-64.
3. Bereznoi, B., Goebels, N., Dang, T., Voltz, R., Walther, E., Zimmermann, C. und Hohlfeld, R.: Therapie der Multiplen Sklerose. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 124 (1999) 595-599.
4. Biddison, W.E., Cruikshank, W.W., Center, D.M., Pelfrey, C.M., Taub, D.D. und Turner, R.V.: CD8+ myelin peptide-specific T cells can chemoattract CD4+ myelin peptide-specific T cells: importance of IFN-inducible protein 10. *J. Immunol.* 160 (1998) 444-448.
5. Biddison, W.E., Taub, D.D., Cruikshank, W.W., Center, D.M., Connor, E.W. und Honma, K.: Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8⁺ T cells. Potential roles in inflammation. *J.Immunol.* 158 (1997) 3046-3053.
6. Birnbaum, G. und Van Ness, B.: Quantitation of T-cell receptor V beta chain expression on lymphocytes from blood, brain, and spinal fluid in patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *Ann.Neurol.* 32 (1992) 24-30.
7. Burgoon, M. P., Owens, G. P., Carlson, S., Maybach, A. L. & Gilden, D. H. Antigen discovery in chronic human inflammatory central nervous system disease: panning phage-displayed antigen libraries identifies the targets of central nervous system-derived IgG in subacute sclerosing panencephalitis. *J. Immunol.* 167, 6009-6014 (2001).
8. Bradl, M. und Linington, C.: Animal models of demyelination. *Brain Pathol.* 6 (1996) 303-311.
9. Brocke, S., Gijbels K., Allegretta M., et al. Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature* 379, 343-346(1996).
10. Brosnan, C.F. und Raine, C.S.: Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 6 (1996) 243-257.

11. Chabas D., Baranzini S.E., Mitchell D., Bernard C., Rittling S.R., Denhardt D.T., Sobel R.A., Lock C., Karpuj M., Pedotti R., Heller R., Oksenberg J. R., Steinman L. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294, 1731-1735 (2001).
12. Chou, Y.K., Bourdette, D.N., Offner, H., Whitham, R., Wang, R.-Y., Hashim, G.A. und Vandenberg, A.A.: Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* 38 (1992) 105-114.
13. Cochet, M., Pannetier, C., Regnault, A., Darche, S., Leclerc, C. und Kourilsky, P.: Molecular detection and in vivo analysis of the specific T cell response to a protein antigen. *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 2639-2647.
14. Compston, D.A., Morgan, B.P., Campbell, A.K., Wilkins, P., Cole, G., Thomas, N.D. und Jasani, B.: Immunocytochemical localization of the terminal complement complex in multiple sclerosis. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 15 (1989) 307-316.
15. Davis, M.M. und Bjorkman, P.J.: T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334 (1988) 395-402.
16. Dickson D.W., Mattiace L.A., Kure K., Hutchins K., Lyman W.D., Brosnan C.F. 1991. Microglia in human disease, with an emphasis on acquired immune deficiency syndrome. *Lab Invest* 64:135-156.
17. Ebers, G.C. und PRISM (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis): Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352 (1998) 1498-1504
18. Fazekas, F., Deisenhammer, F., Strasser-Fuchs, S., Nahler, G., Mamoli, B. und The Austrian Immunoglobulin in Multiple Sclerosis Study Group: Randomized placebo-controlled trial of monthly intravenous immunoglobulin therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 349 (1997) 589-593.
19. Fontana A., Constam D., Frei K., Huber D., Malipiero U., Nohava K., Piani D., Schreiber E. 1992 Immune response to brain tumors. *Semin. Neuroscience* 4: 265-271.
20. Genain, C.P., Cannella, B., Hauser, S.L. und Raine, C.S.: Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature Medicine* 5 (1999) 170-175.
21. Genain, C.P., Nguyen, M.-H., Letvin, N.L., Pearl, R., Davis, R.L., Adelman, M., Lees, M.B., Linington, C. und Hauser, S.L.: Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J.Clin.Invest.* 96 (1995) 2966-2974.
22. Goebels, N., Hofstetter, H., Schmidt, S., Brunner, C., Wekerle, H. und Hohlfeld, R.: Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence. *Brain* 508-518 (2000).

23. Goebels, N. und Hohlfeld, R.: Inflammatory myopathies. In: Principles of Molecular Rheumatology. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 2000, pp. 363-374.
24. Goebels, N., Skulina, C., Wekerle, H. und Hohlfeld, R.: Detection of identical expanded T cell clones in the CSF and peripheral blood of multiple sclerosis patients during relapse. *J. Neurology* 247 (2000) III/40
25. Goebels, N., Wiesener, S., Roers, A., Müller-Felber, W., Pongratz, D., Wekerle, H. und Hohlfeld, R.: Identical expanded CD8⁺ T cell clones in both muscle and peripheral blood of polymyositis patients detected by CDR3 spectratyping. *Neurology* 52, Suppl. 2 (1999) A463
26. Gorski, J., Piatek, T., Yassai, M. und Maslanka, K.: Improvements in repertoire analysis by CDR3 size spectratyping. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 756 (1995) 99-102
27. Grenier, Y., Ruijs, T.C.G., Robitaille, Y., Olivier, A. und Antel, J.P.: Immunohistochemical studies of adult human glial cells. *J.Neuroimmunol.* 21 (1989) 103-115.
28. Griffiths, G.M.: The cell biology of CTL killing. *Curr.Opin.Immunol.* 7 (1995) 343-348
29. Hafler, D.A. und Weiner, H.L.: Immunologic mechanisms and therapy in multiple sclerosis. *Immunol.Rev.* 144 (1995) 75-107.
30. Hartung, H.-P., Gonsette, R.E. und MIMS-Study Group: Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis (MS): A placebo-controlled, randomized, observer-blind European phase III multicenter study - clinical results. *Mult.Scler.* 4 (1998) 325
31. Hemmer, B., Vergelli, M., Pinalli, C., Houghten, R., Martin, R.: Probing degeneracy in T cells using peptide combinatorial libraries. *Immunol. Today* 1998; 19: 163-168.
32. Hickey, W.F., Hsu B.L., Kimura, H. 1991. T-Lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 28: 254-260.
33. Hodgkin, P.D. und Basten, A.: B cell activation, tolerance and antigen-presenting function. *Curr.Opin.Immunol.* 7 (1995) 121-129.
34. Hohlfeld, R.: Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 120 (1997) 865-916.
35. Hohlfeld, R.: Therapeutic strategies in multiple sclerosis. I. Immunotherapy. *Phil.Trans.R.Soc.Lond.B* 354 (1999) 1697-1710.
36. Hohlfeld, R. & Wiendl, H. The ups and downs of multiple sclerosis therapeutics. *Ann. Neurol.* 49, 281-284 (2001).

37. Honegger, P., Matthieu, J.M. und Lassmann, H.: Demyelination in brain cell aggregate cultures, induced by a monoclonal antibody against the myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *Schweiz.Arch.Neurol.Psychiatr.* 140 (1989) 10-13.
38. Huseby, E. S., Liggit D., Brabb T., et al. A pathogenic role for myelin-specific CD8⁺ T cells in a model for multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 194, 669-676 (2001).
39. Jacobs, L.D., Cookfair, D.L., Rudick, R.A., Herndon, R.M., Richert, J.R., Salazar, A.M., Fischer, J.S., Goodkin, D.E., Granger, C.V., Simon, J.H., Emrich, L.J., Bartoszak, D.M., Bourdette, D.N., Braiman, J., Brownschidle, C.M., Coats, M.E., Cohan, S.L., Dougherty, D.S., Kinkel, R.P., Mass, M.K., Munschauer, F.E., Priore, R.L., Pullicino, P.M., Scherokman, B.J., Weinstock-Guttman, B., Whitham, R.H. und The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG): A phase III trial of intramuscular recombinant interferon beta as treatment for exacerbating-relapsing multiple sclerosis: Design and conduct of study and baseline characteristics of patients. *Mult. Scler.* 1 (1995) 118-135.
40. Jacobsen, M., Cepok S., Quak E., Happel M., Gaber R., Ziegler A., Schock S., Oertel W. H., Sommer N., Hemmer B.. Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in the cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 125, 538-550 (2002).
41. Janeway, C. A. und Travers, P.: *Immunologie* (1994). Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford.
42. Jiang, H., Zhang S.I., Pernis B. 1992. Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256: 1213-1215.
43. Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., Schiffer, R.B., Vollmer, T., Weiner, L.P., Wolinsky, J.S. und The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group: Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-relapsing multiple sclerosis. Results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 45 (1995) 1268-1276.
44. Jurewicz, A., Biddison, W.E. und Antel, J.P.: MHC class I restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide specific CD8 T lymphocytes. *J.Immunol.* 160 (1998) 3056-3059.
45. Kabat, E.A., Moore, D.H. und Landow, H.: An electrophoretic study of the protein components in the cerebrospinal fluid and their relationship to serum proteins. *J Clin.Invest.* 21 (1942) 571-577.
46. Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Klinkert, W.E.F., Kolbeck, R., Hoppe, E., Stadelmann, C., Lassmann, H., Wekerle, H. und Hohlfeld, R.: Activated human T cells, B cells and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in vitro and in brain lesions: A neuroprotective role of inflammation? *J.Exp.Med.* 189 (1999) 865-870.
47. Kim, S.U., Murray, M.R., Tourtellotte, W.W. und Parker, J.A.: Demonstration in tissue culture of myelinotoxicity in cerebrospinal fluid and brain extracts from multiple sclerosis patients. *J. Neuropathol.Exp.Neurol* 29 (1970) 420-431.

48. Koh, D.-R., Fung-Leung, W.-P., Ho, A., Gray, D., Acha-Orbea, H. und Mak, T.W.: Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. *Science* 256 (1992) 1210-1213.
49. Lafaille JJ. Keere FV. Hsu AL. Baron JL. Haas W. Raine CS. Tonegawa S. Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. [Journal Article] *Journal of Experimental Medicine*. 186(2):307-12, 1997
50. Lassmann, H., Zimprich, F., Rössler, K. und Vass, K.: Inflammation in the nervous system. Basic mechanisms and immunological concepts. *Rev.Neurol.* 147 (1991) 763-781.
51. Laterre, E.C., Callewaert, A., Heremans, J.F. und Sfaello, Z.: Electrophoretic morphology of gamma globulins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis and other diseases of the nervous system. *Neurology* 20 (1970) 982-990.
52. Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C. und Vass, K.: Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am.J.Pathol.* 130 (1988) 443-454.
53. Linington, C. und Lassmann, H.: Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: Correlation of serum demyelinating activity with antibody titer to myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J.Neuroimmunol.* 17 (1987) 61-70.
54. Lisak, R.P.: Intravenous Immunoglobulins in multiple sclerosis. *Neurology* 51 (Suppl.5) (1998) S25-S29
55. Liu, C. und Blumhardt, L.D.: Randomized, double-blind, placebo controlled study of interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis analyzed by area under disability/time curves. *J.Neurol.Neurosurg.Psy.* 67 (1999) 451-456.
56. Lowenthal, A., van Sande, M. und Karcher, D.: The differential diagnosis of neurological diseases by fractioning electrophoretically the CSF G-globulin. *J.Neurochem.* 6 (1960) 51-56.
57. Lucchinetti, C.F., Brück, W., Rodriguez, M. und Lassmann, H.: Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathol.* 6 (1996) 259-274.
58. Mancardi, G.L., Sardanelli, F., Parodi, R.C., Melani, E., Capello, E., Inglese, M., Ferrari, A., Sormani, M.P., Ottonelli, C., Levrero, F., Uccelli, A. und Bruzzi, P.: Effect of copolymer-1 on serial gadolinium enhanced MRI in relapsing remitting multiple sclerosis. *Neurology* 50 (1998) 1127-1133.
59. Martin, R., McFarland, H.F. und McFarlin, D.E.: Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu.Rev.Immunol.* 10 (1992) 153-187.

60. Martin R., Sturzebecher C.S., McFarland H.F., Immunotherapie of multiple sclerosis: where are we? Where should we go? *Nat. Immunology* 2001; 785-788.
61. Massa, P.T., Ozato, K. und McFarlin, D.E.: Cell type-specific regulation of major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in astrocytes, oligodendrocytes and neurons. *Glia* 8 (1993) 201-207.
62. Medana I.M. Gallimore A. Oxenius A. Martinic M.M. Wekerle H. Neumann H. MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway,. *European Journal of Immunology*. 30(12):3623-33 (2000).
63. Medana, I., Martinic, M. A., Wekerle, H. & Neumann, H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 159, 809-815 (2001).
64. Murray, P.D., Pavelko, K.D., Leibowitz, L., Lin, X. und Rodriguez, M.: CD4+ and CD8+ T cells make discrete contributions to demyelination and neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis. *J. Virol.* 72 (1998) 7320-7329.
65. Neumann H.: Control of Glial Immune Function by Neurons, *Glia* 39 (2001) 191-199
66. Neumann H., Medana I.M., Bauer J., Lassmann H.: Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 313-319.
67. Noseworthy, J.H.: Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399 (1999) A40-A47.
68. Noseworthy, J.H., Gold, R. und Hartung, H.-P.: Treatment of multiple sclerosis: Recent trial and future perspectives. *Curr.Opin.Neurol.* 12 (1999) 279-293.
69. Noseworthy J.H., Lucchinetti C.F., Rodriguez M., Weinshenker B.G.2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:838–938.
70. Oksenberg, J.R., Panzara, M.A., Begovich, A.B., Mitchell, D., Erlich, H.A., Murray, R.S., Shimonkevitz, R., Sherritt, M., Rothbard, J., Bernard, C.C.A. und Steinman, L.: Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature* 362 (1993) 68-70.
71. Oksenberg, J.R., Stuart, S., Begovich, A.B., Bell, R.B., Erlich, H.A., Steinman, L. und Bernard, C.C.A.: Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V β transcripts in brains of multiple sclerosis patients. *Nature* 345 (1990) 344-346.
72. Olivares-Villagómez, D., Wang, Y. und Lafaille, J.: Regulatory CD4⁺ T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1883-1894.

73. Owens, T., Wekerle, H. & Antel, J. Genetic models for CNS inflammation. *Nature Med.* 7, 161-166 (2001).
74. Pannetier, C., Even, J. und Kourilsky, P.: T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol.Today* 16 (1995) 176-181.
75. Prineas, J.W. und Graham, J.S.: Multiple sclerosis: Capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin break down. *Ann.Neurol.* 10 (1981) 149-158.
76. Puisieux, I., Even, J., Pannetier, C., Jotereau, F., Favrot, M. und Kourilsky, P.: Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas. *J.Immunol.* 153 (1994) 2807-2818.
77. Redwine JM. Buchmeier MJ. Evans CF. In vivo expression of major histocompatibility complex molecules on oligodendrocytes and neurons during viral infection. [Journal Article] *American Journal of Pathology.* 159(4):1219-24, 2001 Oct.
78. Schwab, R., Szabo, P., Manavalan, J.S., Weksler, M.E., Posnett, D.N., Pannetier, C., Kourilsky, P. und Even, J.: Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans. *J. Immunol.* 158 (1997) 4493-4499.
79. Schwartz, R.H.: Models of T cell anergy: Is there a common molecular mechanism? *J.Exp.Med.* 184 (1996) 1-8.
80. Scolding, N.J., Houston, W.A.J., Morgan, B.P., Campbell, A.K. und Compston, D.A.S.: Reversible injury of cultured rat oligodendrocytes by complement. *Immunology* 67 (1989) 441-446.
81. Sörensen, P.S., Wanscher, B., Jensen, C.V., Schreiber, K., Blinkenberg, M., Ravnborg, M., Kirsmeier, H., Larsen, V.A. und Lee, M.L.: Intravenous immunoglobulin G reduces MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 50 (1998) 1273-1281.
82. Stangel, M., Hartung, H.-P. und Gold, R.: Intravenous immunoglobulin treatment of neurological autoimmune diseases. *J.Neurol.Sci.* 153 (1998) 203-214.
83. Steinman, L.: Multiple sclerosis: A coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85 (1996b) 299-302.
84. Storch, M. und Lassmann, H.: Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr.Opin.Neurol.* 10 (1997) 186-192.
85. Storch, M.K., Piddlesden, S., Haltia, M., Iivanainen, M., Morgan, P. und Lassmann, H.: Multiple sclerosis: In situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann.Neurol.* 43 (1998) 465-471.
86. Sun, D., Qin, Y., Chluba, J., Epplen, J.T. und Wekerle, H.: Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T- cell interactions. *Nature* 332 (1988) 843-845.

87. Sun, D., Whitaker J.N., Huang Z., et al. Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 166, 7579-7587 (2001).
88. Tonegawa, S.: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302 (1983) 575-581.
89. Tourtellotte, W.W., Walsh, M.J., Baumhefner, R.W., Staugaitis, S.M. und Shapshak, P.: The current status of multiple sclerosis intra-blood-brain-barrier IgG synthesis. *Ann.N Y.Acad.Sci* 436 (1984) 52-67.
90. Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mörk, S. und Bö, L.: Axonal transection in the lesion of multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 338 (1998) 278-285.
91. Tsuchida, T., Parker, K.C., Turner, R.V., McFarland, H.F., Coligan, J.E. und Biddison, W.E.: Autoreactive CD8⁺ T cell responses to human myelin protein-derived peptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91 (1995) 10859-10863.
92. Van de Keere, F. und Tonegawa, S.: CD4⁺ T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1875-1882.
93. Walsh, M.J. und Tourtellotte, W.W.: Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA and IgM in multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* 163 (1986) 41-53.
94. Wekerle, H., Linington C., Lassmann H., Meyermann R. 1986. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neuroscience* 9: 271-277
95. Wekerle, H.: Immunology of multiple sclerosis. In Compston, A., Lassmann, H., McDonald, W.I., Matthews, B. und Wekerle, H. (Hrg.), *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Churchill Livingstone, London, 1998, pp.379-408.
96. Wekerle, H., Bradl, M., Linington, C., Kääh, G. und Kojima, K.: The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus. *Immunol.Rev.* 149 (1996) 231-243.
97. Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H. und Linington, C.: Animal models. *Ann.Neurol.* 36 (1994) S47-S53
98. Wiendl, H., Neuhaus, O., Kappos, L. und Hohlfeld, R.: Multiple Sklerose: Aktuelle Übersicht zu fehlgeschlagenen oder abgebrochenen Therapiestudien. *Nervenarzt* 71 (2000) 597-610.
99. Wucherpfennig, K.W., Newcombe, J., Li, H., Keddy, C., Cuzner, M.L. und Hafler, D.A.: T cell receptor V alpha-V beta repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J.Exp.Med.* 175 (1992) 993-1002.

100. Wucherpfennig, K.W. und Strominger, J.L.: Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80 (1995) 695-705.
101. Zamvil, S. S. & Steinman, L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 579-621 (1990).
102. Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H.L. und Hafler, D.A.: 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.* 179 (1994) 973-984.
103. Zipp, F. und Hohlfeld, R.: Aktuelle Therapie der multiplen Sklerose: "T-Zellvakzination". *Nervenarzt* 65 (1994) 424-42.

VII LEBENSLAUF

- Geboren am 11.3.1976 in Regensburg
- Deutsche Staatsangehörigkeit
- Vater Dr. med. Christian Skulina, Neurologe, Mutter Brigitte Skulina, Hausfrau

Schule

- Grundschule in Erlangen ab 1982
- Gymnasium Fridericianum Erlangen von 1986-1995
- Bayerischen Hochbegabtenförderung (Maximilianeum, 1995 bis 2001)

Studium der Humanmedizin

Vorklinik und Klinik

- Ludwig Maximilian Universität ab 1995, seit 1997 in Zusammenarbeit mit Harvard Medical School, Boston.
 - Ärztliche Vorprüfung im Herbst 1997
 - 1. Staatsexamen im Herbst 1998
 - 2. Staatsexamen im Frühjahr 2001
 - 3. Staatsexamen im Frühjahr 2002

Klinische und wissenschaftliche Tätigkeit

- Von Mai 2002 bis November 2002 Arzt im Praktikum am Institut für Klinische Neuroimmunologie in München.
- Seit Dezember 2002 Assistenzarzt in der Neurologie des Universitätsspitals Zürich, Schweiz.
- Vortrag mit dem Titel
„Multiple sclerosis: Expanded CSF T cell clones are also present in the brain tissue“
(C. Skulina, S. Schmidt, H. Wekerle, R. Hohlfeld, N. Goebels) im Rahmen des Treffens der European Neurological Society (ENS) in Berlin im Juni 2002, ausgezeichnet als bester Beitrag im Bereich Grundlagenforschung.