

Aus dem Max-Planck Institut für Neurobiologie, Abteilung Neuroimmunologie

Direktor Prof. Dr. Hartmut Wekerle

und

dem Institut für Klinische Neuroimmunologie der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld

**ETABLIERUNG EINES TIERMODELLS FÜR  
PARANEOPLASTISCHE NEUROLOGISCHE ERKRANKUNGEN**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hannah Luise Pellkofer

aus

München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Voltz

2. Berichterstatter Prof. Dr. J. Johnson

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Emmerich

Prof. Dr. C. Haass

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. A. Schubart

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 21. April 2005

Meinen Eltern  
In Liebe und Dankbarkeit



<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>Paraneoplastische neurologische Syndrome</b>	<b>9</b>
1.1.1	Definition	9
1.1.2	Epidemiologie	9
1.1.3	Klinische Symptomatik	10
1.1.4	Pathogenese	10
	<i>Rolle der Antikörper</i>	11
	<i>Rolle der T-Zellen</i>	14
1.1.5	Diagnose	15
1.1.6	Pathologie	17
1.1.7	Therapie	18
1.1.8	Prognose	19
1.1.9	Antikörperreaktivitäten	20
	<i>Yo</i>	20
	<i>PNMA1</i>	22
<b>1.2</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>27</b>
2.1.1	Versuchstiere	27
2.1.2	Kulturmedium für prokaryontische Zellen	27
	<i>LB-Medium</i>	27
	<i>LB-Agar Platten</i>	27
2.1.3	Kulturmedien für eukaryontische Zellen	27
	<i>Eagles Hepes</i>	28
	<i>DMEM/Asn</i>	28
	<i>Komplettes DMEM</i>	28
	<i>Restimulationsmedium</i>	28
	<i>TCGF (T cell growth factor)</i>	28
	<i>Einfriermedium</i>	28
	<i>Medium für MLA-Zellen</i>	29
	<i>Hitzeinaktivierungen</i>	29
	<i>MLA-Überstand</i>	29
2.1.4	(Allgemein) Puffer und Reagenzien	29
	<i>PBS</i>	29
	<i>Paraformaldehyd (PFA)</i>	29
	<i>Harnstoffpuffer</i>	30
	<i>Waschpuffer für Nickelsäule</i>	30
	<i>Elutionspuffer für Nickelsäule</i>	30
	<i>Acetatpuffer</i>	30
	<i>TBS</i>	30
	<i>DEPC- H<sub>2</sub>O</i>	30

2.1.5	Lösungen für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blotting:	30
	<i>Bestandteile des Polyacrylamidgels</i>	30
	<i>Laufpuffer</i>	31
	<i>10 x Protein-Auftragspuffer</i>	31
	<i>Biotrap-Puffer (Protein)</i>	31
	<i>Coomassie-Färbelösung</i>	31
	<i>Coomassie-Entfärber</i>	31
	<i>Transferpuffer für Westernblotting</i>	32
	<i>Waschpuffer für Blot-Membran (TBS-T)</i>	32
2.1.6	Lösungen für Proteinbestimmung nach Lowry	32
	<i>Lowry-Reagenz Lösung</i>	32
	<i>Folin &amp; Ciocalteu's Phenolreagenz, Arbeitslösung</i>	32
2.1.7	Puffer für DNA-Analysen	32
	<i>Ethidiumbromid-Lösung</i>	32
	<i>10 x TBE-Puffer</i>	33
	<i>DNA-Auftragspuffer</i>	33
2.1.8	Puffer für ELISA	33
	<i>Auftragspuffer</i>	33
	<i>OPD-Puffer</i>	33
	<i>Stop-Lösung</i>	33
	<i>Waschpuffer</i>	33
2.1.9	Zytokin-ELISA	33
2.1.10	Puffer für FACS-Analyse	34
	<i>FACS-Puffer</i>	34
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>34</b>
2.2.1	Gewinnung von cDNA	34
	<i>Organentnahme</i>	34
	<i>RNA-Gewinnung</i>	34
	<i>Präparation von mRNA</i>	35
	<i>Herstellung von Ribonuklease-freiem Wasser</i>	35
	<i>Reverse Transkription</i>	35
2.2.2	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	36
	<i>Genome walk PCR</i>	38
	<i>Primer-Design</i>	38
	<i>Analyse der PCR-Produkte auf Agarosegelen</i>	39
	<i>Konzentrationsbestimmungen von RNA und cDNA</i>	39
	<i>Reinigung der PCR-Produkte</i>	40
	<i>Extraktion der PCR-Produkte aus Agarosegelen</i>	40
	<i>Sequenzierung der PCR-Produkte</i>	40
2.2.3	Klonierung in einen Expressionsvektor	40
	<i>Präparation von Plasmidvektoren</i>	41
	<i>Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren</i>	41
	<i>Hitzeschocktransformation von Bakterienzellen</i>	42

<i>Herstellung elektrokompenter Zellen</i> .....	42
<i>Elektrotransfektion von Bakterienzellen</i> .....	42
<i>Kolonie-PCR</i> .....	43
<i>Minipreps</i> .....	43
<b>2.3 Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>44</b>
2.3.1 Aufreinigung von rekombinantem Protein .....	44
<i>Übernachtkultur</i> .....	45
<i>Induktion</i> .....	45
<i>Zellaufschluss</i> .....	45
<i>Nickel-Chelat-Chromatographie</i> .....	46
<i>Reinigung über Inclusion Bodies</i> .....	47
<i>Mini Ni Spin Kit</i> .....	48
<i>Reinigung von Proteinen mit präparativen denaturierenden SDS-</i> <i>Polyacrylamidgelen</i> .....	48
<i>Elektroelution von Proteinen mit dem „Biotrap“ Elektroseparationssystem</i> ...	49
<i>Methanol-Präzipitation von Proteinen</i> .....	49
2.3.2 Western-Blotting.....	50
2.3.3 Dialyse.....	51
2.3.4 Ultrafiltration .....	52
2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	52
2.3.6 Coomassie-Blau-Färbung .....	54
2.3.7 Quantitative Proteinbestimmung .....	54
<i>Lowry-Assay</i> .....	54
<i>Bradford-Assay</i> .....	55
2.3.8 Sterilisation von Proteinen.....	56
2.3.9 Enzyme Linked Immuno Sorbant Assays (ELISAs).....	56
<i>Bestimmung rPnmal spezifischer Antikörper</i> .....	56
<i>Zytokin-ELISA</i> .....	57
2.3.10 Analyse des Oberflächenphänotyps mit Hilfe des fluoreszenzaktivierten Zell-Sortierers (FACS).....	57
<i>FACS-Analyse der T-Zelllinien</i> .....	58
<b>2.4 Tierexperimente</b> .....	<b>60</b>
2.4.1 Immunisierung der Tiere.....	60
<i>Aktive Immunisierung</i> .....	60
<i>Adoptiver Transfer spezifischer T-Zellen</i> .....	60
2.4.2 Evaluation des klinischen Status der Tiere .....	61
2.4.3 Gewebeentnahme für Zellkultur .....	61
2.4.4 Perfusion der Tiere zur histologischen Analyse .....	62
<b>2.5 Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>62</b>
2.5.1 Kultivierung von Säugerzellen .....	62
2.5.2 Etablierung einer Ratten T-Zelllinie .....	62
<i>Primärkultur von Ratten T-Zelllinien</i> .....	62
<i>Kultivierung von Ratten T-Zelllinien</i> .....	63

<i>Restimulation von Ratten T-Zelllinien</i> .....	63
<i>Isolierung von Thymozyten</i> .....	64
<i>Dichtegradientenzentrifugation</i> .....	64
2.5.3 Proliferationstest .....	65
2.5.4 Lebendzellzahlbestimmung durch Färbung mit Trypanblau .....	66
2.5.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	66
<b>2.6 Chemikalienliste</b> .....	<b>67</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>71</b>
<b>3.1 Ovalbumin</b> .....	<b>71</b>
3.1.1 Etablierung einer Ovalbumin-spezifischen T-Zelllinie .....	71
3.1.2 Adoptiver Transfer Ovalbumin-spezifischer T-Zellen .....	71
<b>3.2 Humanes Yo</b> .....	<b>72</b>
3.2.1 Expression und Reinigung des humanen Yo-Proteins .....	72
3.2.2 Aktive Immunisierung .....	73
3.2.3 Etablierung einer Yo-spezifischen T-Zelllinie .....	75
3.2.4 Adoptiver Transfer hYo-spezifischer CD4+ T-Zellen .....	76
<i>Klinische Symptomatik</i> .....	76
<i>Histopathologie</i> .....	77
3.2.5 Diskussion .....	77
<b>3.3 Ratten Yo</b> .....	<b>79</b>
3.3.1 Klonierung des Ratten-Yo .....	79
3.3.2 Expression und Reinigung des Ratten Yo Proteins .....	80
3.3.3 Aktive Immunisierung .....	81
<i>Krankheitsverlauf</i> .....	81
3.3.4 Etablierung einer rYo-spezifischen T-Zelllinie .....	81
3.3.5 Adoptiver Transfer rYo spezifischer Zellen .....	82
<i>Krankheitsverlauf</i> .....	82
<i>Histobefund</i> .....	83
<b>3.4 Ratten Pnmal</b> .....	<b>85</b>
3.4.1 Klonierung von Ratten-Pnmal .....	85
3.4.2 Expression und Reinigung des rPnmal .....	88
3.4.3 Aktive Immunisierung .....	89
<i>Klinische Symptomatik</i> .....	89
<i>Histopathologie</i> .....	90
<i>Antikörper</i> .....	90
3.4.4 Etablierung und Charakterisierung rPnmal spezifischer T-Zellen in vitro .....	91
<i>Proliferationstest</i> .....	92
<i>Zytokin-ELISA</i> .....	93
<i>Oberflächentypisierung</i> .....	94



3.4.5	rPnma1-spezifische CD4+ T-Zellen induzieren eine Autoimmunenzephalitis .....	97
	<i>Klinische Symptomatik</i> .....	97
	<i>Histopathologie</i> .....	98
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>107</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>147</b>
7.1	Abkürzungen .....	147
7.2	Publikationen, die aus dieser Arbeit entstanden sind.....	151
7.3	Danksagung .....	153
7.4	Lebenslauf.....	154



# **1 Einleitung**

## **1.1 Paraneoplastische neurologische Syndrome**

### **1.1.1 Definition**

Unter einem paraneoplastischen Syndrom versteht man Symptome oder Funktionsstörungen, die im Zusammenhang mit bestimmten Tumoren auftreten können. Dabei werden sie definitionsgemäß nicht durch lokales Tumorwachstum oder Metastasen verursacht und manifestieren sich klinisch häufig, bevor der Tumor durch sein regionales Wachstum auffällt.

Die assoziierten Funktionsstörungen unterscheiden sich pathogenetisch deutlich voneinander und können verschiedene Ebenen des Körpers betreffen. So äußern sie sich beispielsweise in paraneoplastischen Endokrinopathien, Hämostasestörungen, Myopathien und kutanen Paraneoplasien, jedoch auch ebenso am Nervensystem in Form paraneoplastischer neurologischer Syndrome. Diese Arbeit konzentriert sich auf paraneoplastische Erkrankungen des zentralen Nervensystems (PNS) (Posner et al., 1995, Graus et al., 2004).

### **1.1.2 Epidemiologie**

Paraneoplastische neurologische Erkrankungen sind selten und betreffen weniger als 1% aller Tumorpatienten. Der häufigste mit neurologischen Störungen assoziierte Tumor ist das kleinzellige Bronchialkarzinom, jedoch auch gynäkologische Tumore sind häufig als Ursache zu finden. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient mit einem kleinzelligen Bronchialkarzinom auch an einem paraneoplastischen neurologischen Syndrom leidet liegt bei etwa 5%.

Bei neurologischen Patienten sind diese Erkrankungen nicht so selten wie bisher angenommen. Beispielsweise liegt die Wahrscheinlichkeit, dass die neurologische Symptomatik auf einen Tumor zurückzuführen ist bei Patienten mit Lambert-Eaton Myasthenie Syndrom um die 60%.

### 1.1.3 Klinische Symptomatik

Paraneoplastische neurologische Erkrankungen können jede Ebene des Nervensystems betreffen und präsentieren sich klinisch bunt. Häufige Syndrome sind sensomotorische Polyneuropathien, subakute Kleinhirndegeneration, limbische Enzephalitis, Opsoklonus/Myoklonus-Syndrom, Rhombenzephalitis, Motoneuron-erkrankung, Neuromyotonie, Stiffman-Syndrom, Lambert-Eaton Myasthenie Syndrom, Myasthenia gravis und Dermato-/Polymyositis. Die Manifestation der neurologischen Erkrankung geht der Diagnosestellung eines Tumors in der Regel voraus. Dabei verlaufen paraneoplastische neurologische Erkrankungen des ZNS charakteristischerweise akut oder subakut und stabilisieren sich häufig nach einigen Wochen oder Monaten.

### 1.1.4 Pathogenese

Die Pathogenese paraneoplastischer neurologischer Erkrankungen ist nicht sicher geklärt. Lange Zeit wurden metabolisch-toxische Veränderungen oder Virusinfektionen als mögliche Pathomechanismen diskutiert und auch in jüngster Zeit sind Fälle der Koinzidenz von Virusinfektionen und PND beschrieben, wie zum Beispiel eine paraneoplastische limbische Enzephalitis mit einer Herpes simplex-Infektion des Temporallappens (Sharshar et al., 2000). Diese Hypothese wird jedoch in zunehmendem Maße unwahrscheinlich, vielmehr wird seit der Entdeckung kreuzreaktiver Antikörper in Serum und Liquor betroffener Patienten, vermehrt ein Autoimmunprozess als zugrundeliegender Pathomechanismus diskutiert. Diese Antikörper reagieren mit Proteinen, die sowohl in Tumor- als auch in Nervenzellen exprimiert werden. Der erste dieser Antikörper, die anti-Hu Reaktivität, wurde 1985 erstmals beschrieben (Graus et al., 1985). Seitdem konnten zahlreiche weitere anti-neuronale Antikörper charakterisiert werden (Tabelle 1).

#### *Rolle der Antikörper*

Anti-neuronale Antikörper sind bei etwa 2/3 der Patienten mit paraneoplastischen neurologischen Erkrankungen nachweisbar und reagieren hochspezifisch sowohl mit dem Tumor als auch mit dem Nervensystem. Sie richten sich gegen Antigene, die

normalerweise ausschließlich in immunprivilegierten Geweben wie Neuronen, Retina oder Hoden zu finden sind und die der Tumor nun in gleicher oder ähnlicher Form „ektop“ exprimiert (Darnell et al., 1996).

Bei einigen paraneoplastischen Syndromen, die die neuromuskuläre Synapse betreffen sind die jeweiligen Autoantikörper als direkt pathogen identifiziert worden. Für das Lambert-Eaton Myasthenie Syndrom (LEMS) existiert beispielsweise ein Tiermodell, bei dem durch den Transfer von Immunglobulinen erkrankter Patienten in Mäusen eine nach elektrophysiologischen und morphologischen Kriterien vergleichbare Erkrankung induziert werden konnte. Zielstruktur dieser Autoimmunreaktion sind hierbei die präsynaptischen spannungsabhängigen Kalziumkanäle VGCC (voltage-gated calcium channel), die durch die Antikörper quantitativ reduziert werden. Bei 85% der Patienten mit LEMS sind Antikörper gegen den P/Q-Typ VGCC nachweisbar. Eine Reduktion des Antikörpertiters durch Plasmapherese oder Immunsuppression kann die Symptomatik verbessern. Auch für die Neuromyotonie konnten die assoziierten Antikörper, die gegen die spannungsabhängigen Kalium-Kanäle (anti-VGKC) gerichtet sind als ursächlich identifiziert werden (Hart et al., 2002). Ebenso geklärt ist der Pathomechanismus der Myasthenia gravis, die assoziiert mit einem Thymom auch als paraneoplastische Erkrankung auftreten kann. Auch hier sind die gegen Acetylcholinrezeptoren der postsynaptischen Membran gerichteten Autoantikörper pathogenetisch bedeutsam und ein IgG-vermitteltes Tiermodell etabliert.

Gemeinsam ist all diesen Antikörperreaktivitäten, dass sie sowohl bei der idiopathischen als auch der paraneoplastischen Form von LEMS, Neuromyotonie und Myasthenia gravis nachweisbar sind, also keine spezifischen Marker für einen Tumor darstellen. Weiterhin sind die Proteine, gegen die bei dieser Erkrankung die Antikörper gerichtet sind, extrazellulär lokalisierte Strukturen, die sich an der Grenze zwischen Nervensystem und dem restlichen Organismus befinden und somit Angriffspunkt für zirkulierende Antikörper sein können. Diese Erkrankungen sind über Hemmung der B-Zellen mittels Plasmapherese oder Immunsuppression günstig zu beeinflussen.

Eine pathogene Rolle für einen paraneoplastischen Antikörper konnte *in vitro* und *in vivo* auch im Falle der anti-Recoverin-Reaktivität gezeigt werden. Dieser Antikörper kann in die Stäbchenzellen eindringen und dort die Apoptose dieser Zellen induzieren, indem er über eine Phosphorylierungsreaktion das Rhodopsin moduliert. Ein Tiermodell in Lewis Ratten ist mittlerweile etabliert (Adamus et al., 1998).

Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Erkrankungen bleibt die Rolle der assoziierten anti-neuronalen Antikörper bei der Pathogenese aller paraneoplastischer neurologischer Syndrome, die das ZNS betreffen unklar. Unbestritten ist hingegen ihr klinischer Wert zur Sicherung der Diagnose (siehe 1.1.4).

Ob und wie diese Antikörper für den neuronalen Schaden verantwortlich gemacht werden können, ob sie ein Epiphänomen sind oder eine direkt pathogene Rolle spielen bleibt weiterhin umstritten. Einerseits konnten sowohl im ZNS wie auch in den assoziierten Tumoren bei Patienten mit PND Ablagerungen onkoneuronaler Antikörper detektiert (Dalmau et al., 1991), sowie deren intrathekale Synthese nachgewiesen werden (Furieux et al., 1990). Darüber hinaus sind die vorherrschenden Isotypen dieser Antikörper in Blut, ZNS und Tumor IgG1 und IgG3 (Jean et al., 1994). Diese beiden IgG Subklassen haben die Eigenschaft, an C1q binden und somit Komplement fixieren zu können und verfügen ebenso als einzige über spezifische Rezeptoren auf Monozyten und Makrophagen. Dies ließ initial vermuten, dass Komplementbindung und Antikörperabhängige Zytotoxizität (ADCC) bei PND eine Rolle spielen.

Andererseits konnten jedoch in den zerebralen entzündlichen Läsionen von PND-Patienten bisher keine natürlichen Killerzellen (NK) und ebenso kein oder kaum Komplement detektiert werden (Furieux et al., 1990; Jean et al., 1994). Dies lässt in Zusammenschau mit der intrazellulären und teilweise nukleären Lokalisation der assoziierten Antigene den Rückschluss zu, dass sowohl Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CMT) wie auch ADCC (vermittelt über NK) in PND wohl eher eine untergeordnete Rolle spielen (Graus et al., 1990; Jean et al., 1994).

Eine Aufnahme von anti-Hu IgG in Neurone und Tumorzellen konnte *in vitro* (Greenlee et al., 1993; Hormigo et al., 1994) und auch *in vivo* (Dalmau et al., 1991)

gezeigt werden, die Daten zur Zytotoxizität der IgG-Fractionen betroffener Patienten waren jedoch kontrovers (Schafer et al., 2000; Verschuuren et al., 1996, Hormigo et al., 1994; Greenlee et al., 1993). Bei anti-Hu positiven Patienten konnte ein zytotoxischer Effekt der Seren nachgewiesen werden, der jedoch interessanterweise unabhängig davon war, ob die Zielzellen tatsächlich Hu Antigen exprimierten. Ebenso konnte diese Reaktion auch nach Depletion der IgG-Fraktion gezeigt werden. Die genauen molekularen Mechanismen dieses Phänomens sind bisher nicht verstanden (Verschuuren et al., 1997).

Dass Autoantikörper bei paraneoplastischen Syndromen des ZNS als alleiniger Auslöser zu werten sind, wird in zunehmendem Maße unwahrscheinlich. Zum einen führt im Gegensatz zu LEMS oder MG eine Reduktion des Antikörper-Titers durch Plasmapherese oder intravenöse Immunglobuline (ivIg) nicht zu einer Besserung der klinischen Symptomatik (Furieux et al., 1990, Graus et al., 1992; Uchuya et al., 1996). Zum anderen ist es bisher nicht gelungen, die Krankheit durch passiven Transfer dieser Antikörper (Graus et al., 1991) oder durch aktive Immunisierung mit dem assoziierten onkoneuronalen Protein im Tiermodell zu reproduzieren. Zwar führte die Immunisierung mit den humanen Proteinen Yo und Hu in allen Studien und verschiedenen Tierstämmen zu einem signifikant erhöhten Antikörper-Titer im Serum, eine klinisch oder neuropathologisch verifizierbare Erkrankung konnte jedoch nicht ausgelöst werden (Sillevis Smitt et al., 1995; Tanaka et al., 1994; Tanaka et al., 1995; Auf et al., 2002).

Hohe Antikörper-Spiegel konnten ebenso durch Immunisierung von Mäusen mit DNA kodierend für das humane Hu- respektive das humane Yo-Protein induziert werden (Carpentier et al., 1998; Sakai et al., 2001). Hierdurch konnte eine deutliche (51%) Volumenreduktion eines Hu-exprimierenden Neuroblastoms in Mäusen erreicht werden, die Tiere zeigten jedoch keinerlei klinisch oder histopathologisch detektierbare neurologische Erkrankung (Carpentier et al., 1998). Dagegen konnte eine Vakzinierung mit für Recoverin kodierender DNA in entsprechend immunisierten Mäusen sowohl eine Induktion spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit

konsekutiver Tumorreduktion in den Tieren, als auch eine Retinopathie auslösen (Maeda et al., 2002).

Nicht zuletzt handelt es sich bei den Zielantigenen dieser Antikörper um intrazelluläre Proteine und es ist deshalb unklar, wie dann die Antikörper Neurone oder Tumorzellen attackieren können (Darnell et al., 1996).

### *Rolle der T-Zellen*

Inzwischen mehren sich die Hinweise, dass für den neuronalen Schaden primär zytotoxische T Zellen verantwortlich sind. Zelluläre Infiltrate, die insbesondere in der Frühphase der Erkrankung nachweisbar sind, wurden schon seit längerem beschrieben (Graus et al., 1990; Dalmau et al., 1991; Jean et al., 1994; Rosenblum et al., 1993; Sutton et al., 2001; Verschuuren et al., 1996; Hormigo et al., 1994).

Über eine Analyse von T-Zell-Rezeptoren in entzündlichen ZNS-Läsionen anti-Hu positiver Patienten konnte eine oligoklonale Expansion zytotoxischer T-Zellen gezeigt werden, eine Beobachtung, die eine primäre Antigen-spezifische T-Zell-Reaktion wahrscheinlich macht (Voltz et al., 1998). Zudem konnten im Liquor akut und chronisch an PND erkrankter Patienten klassische  $\alpha\beta$ -T-Zellen nachgewiesen werden und die innerhalb des ZNS detektierten CD4<sup>+</sup> Zellen anhand ihres Zytokinprofils dem T<sub>H</sub>1-Subtyp zugeordnet werden (Mosmann et al., 1996; Constant et al., 1997), was auf einen aktiven, Zell-vermittelten Entzündungsprozess innerhalb des ZNS hinweist. Verschiedene weitere Studien stützten diese Beobachtung durch den Nachweis Antigen spezifischer T<sub>H</sub>1- und zytotoxischer T-Zellen in Blut und Liquor von anti-Hu und anti-Yo positiven Patienten (Benyahia et al., 1999; Albert et al., 1998, Tanaka et al., 1998, Tanaka et al., 1999). In immunpathologischen Studien konnten dabei die infiltrierenden Lymphozyten häufig in sehr engen Kontakt zu den untergehenden Neuronen nachgewiesen werden (Wanschitz et al., 1997; Forsyth et al., 1997).

Ein Versuch, via DNA-Vakzinierung mit Hilfe Hu-spezifischer T-Zellen ein Tiermodell zu etablieren, zeigte neben der Induktion hoher Antikörper-Titer im Serum eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums in den verwendeten Tieren. Es fanden



sich jedoch weder klinische noch histologische Zeichen einer neurologischen Schädigung (Carpentier et al., 1998).

Interessanterweise konnte bei einem anti-Yo-positivem Patient das Yo Antigen im Primärtumor, nicht jedoch in einer weiter entdifferenzierten zerebralen Metastase nachgewiesen werden. Die Expression des Yo Antigens korrelierte hierbei deutlich mit der Infiltration zytotoxischer T-Zellen (Sutton et al., 2001). Dies wiederum stützt die Hypothese einer CD8+ T-Zell-Antwort gegen paraneoplastische Antigene mit konsekutiv effektiver Tumormunität. Dieser Immunreaktion können sich die Tumorzellen schließlich durch verringerte Yo-Expression entziehen, wodurch schließlich eine Metastasierung des Tumors möglich wird.

Ob diese gegen onkoneuronale Proteine gerichteten T-Zellen jedoch ein Epiphänomen darstellen oder pathogenetisch bedeutsam sind, ist nicht sicher bekannt. Auch wenn es bisher nicht direkt gezeigt werden konnte wird eine pathogenetische Rolle der T-Zellen zunehmend wahrscheinlich.

### **1.1.5 Diagnose**

Da sich paraneoplastische neurologische Erkrankungen klinisch sehr bunt präsentieren müssen sie bei vielen Symptomen in die differenzialdiagnostischen Überlegungen miteinbezogen werden.

Das kraniale MRT kann es bei diesen Erkrankungen pathologisch zur Darstellung kommen mit beispielsweise einer T2-Hyperintensität mit Kontrastmittelaufnahme im limbischen System bei einer Ma-assoziierten Enzephalitis oder einer Kleinhirnatrophie im Spätstadium einer PCD (Rosenfeld et al., 2003). Ein normales MRT schließt eine paraneoplastische Erkrankung keineswegs aus.

Der Liquor erscheint dabei häufig chronisch entzündlich verändert mit leichter Pleozytose und Proteinerhöhung sowie oligoklonalen Banden.

Als entscheidender diagnostischer Parameter dienen jedoch die hochspezifischen antineuronalen Antikörper in Serum und Liquor. Diese Antikörper reagieren spezifisch mit dem Tumor und dem Nervensystem und sind bei etwa 50-60% aller Patienten mit einem paraneoplastischen Syndrom nachzuweisen, d.h. die Diagnose

eines paraneoplastischen Syndroms kann auch bei fehlendem Nachweis der Antikörper gestellt werden. Ihre Detektion beweist jedoch, aufgrund einer Spezifität von nahezu 100%, die paraneoplastische Ätiologie einer neurologischen Symptomatik. Die Detektion der Antikörper-Reaktivitäten ist somit ein wichtiger Indikator für einen oftmals noch okkulten Tumor und eröffnet die Möglichkeit einer frühzeitigen Tumordiagnose und –therapie. Ein fehlender Tumornachweis liegt dann eher an der mangelnden Sensitivität der verwendeten Diagnostik.. Darüber hinaus können onkoneuronale Antikörper aufgrund ihrer zum Teil hochspezifischen Assoziation mit bestimmten Tumortypen die Suche nach einem okkulten Neoplasma auf wenige Organe reduzieren. In einigen Fällen ist die Korrelation zwischen Antikörper und assoziiertem Tumor so hoch, dass bei dessen Detektion und typischer klinischer Symptomatik zu einer Operation geraten wird, selbst wenn auch intensive Suche keinen Nachweis der oft mikroskopisch kleinen Tumore erbringen konnte.

Mittlerweile hat sich bei fehlendem Tumornachweis in den konventionellen Screeningmethoden auch das Ganzkörper FDG-PET als Methode der Wahl zur Detektion eines okkulten Neoplasmas etabliert, welche bei fehlendem Tumornachweis und persistierendem Verdacht auf eine paraneoplastische Ätiologie engmaschig wiederholt werden müssen (Rees et al., 2001; Antoine et al., 2000, Linke et al., 2004).

Ergibt die Tumorsuche eine Neoplasie, die mit der nachzuweisenden Antikörperreaktivität bislang nicht assoziiert war, muss man auch die Möglichkeit eines Zweitumors in Betracht ziehen, insbesondere dann, wenn der Tumor das assoziierte Antigen nicht exprimiert (Graus et al., 2001).

Zur Diagnosestellung eines paraneoplastischen neurologischen Syndroms gelten die aktuellen Richtlinien, in denen gesicherte von möglichen PND unterschieden werden (Graus et al., 2004). So ist sind die Bedingungen für *gesicherte* PND bei folgenden Konstellationen erfüllt:

1. Patient mit ätiologisch anderweitig nicht erklärbarer neurologischer Symptomatik *und* Detektion spezifischer anti-neuronaler Antikörper. Ein Tumornachweis ist nicht zwingend erforderlich.

2. Patient mit einem typischen mit Paraneoplasie assoziiertem neurologischen Syndrom, das sich innerhalb von fünf Jahren nach Entdeckung eines Tumors manifestiert *ohne* anti-neuronale Antikörper
3. Patient mit neurologischem Syndrom unklarer Ätiologie, das sich unter onkologischer Therapie ohne begleitende Immunmodulation bessert *ohne* anti-neuronale Antikörper.

Unter einem *möglichen* paraneoplastischen neurologischem Syndrom subsumiert man die Koinzidenz folgender Befunde:

1. Patient mit ätiologisch unklarem neurologischen Syndrom *ohne* anti-neuronale Antikörper *und* Tumormanifestation innerhalb von zwei Jahren nach Auftreten der neurologischen Symptome *und* fehlende neurologische Besserung unter isolierter Tumorthherapie
2. Patient mit einem typischen paraneoplastischem neurologischem Syndrom (s.o.) *ohne* anti-neuronale Antikörper *ohne* Tumornachweis, jedoch weniger als fünf Jahren Latenz seit Manifestation der neurologischen Symptomatik.

### 1.1.6 Pathologie

Die neuropathologischen Befunde sind in Abhängigkeit vom zugrundeliegenden neurologischen Syndrom unterschiedlich ausgeprägt. In der Regel zeigt sich histopathologisch ein Untergang von Neuronen sowie Gliose und in einigen Patienten auch eine intrazelluläre Aufnahme von Antikörpern (Dalmau et al., 1991) kombiniert mit typischen entzündlichen Veränderungen in verschiedenen Regionen des ZNS. Dabei infiltrieren CD3+ T-Zellen diffus das Endoneurium, aggregieren um Neurone herum und stehen dabei zu diesen in engem Kontakt. Perivaskulär setzen sich diese Infiltrate insbesondere aus CD4+ T Helfer Zellen und B Zellen zusammen, interstitiell hingegen sind hauptsächlich zytotoxische CD8+ T-Zellen lokalisiert. Auch CD68+ Makrophagen infiltrieren diffus das Endoneurium, kerben jedoch im Gegensatz zu den CD3+ Zellen die Oberfläche der Neurone nicht ein. Zytoplasma und Kerne

einiger Neurone stellten sich in der IgG-Färbung positiv dar, die CD8<sup>+</sup> T-Zellen jedoch standen zu sowohl zu IgG positiven wie auch zu IgG negativen Neuronen in engem Kontakt (Wanschitz et al., 1997). Aufgrund der Fähigkeit von Neuronen konstitutionell auch MHC Klasse I zu exprimieren kann der enge Kontakt der T-Zellen zu den Neuronen durchaus als Hinweis für eine zumindest partiell T-Zell-vermittelte Erkrankung gewertet werden. Dabei scheint der neuronale Zelltod zytotoxisch via T-Zellen und nicht apoptotisch vermittelt zu sein (Bernal et al., 2002).

### 1.1.7 Therapie

Die therapeutischen Optionen für die paraneoplastischen Erkrankungen des ZNS sind weit weniger gut als für die der neuromuskulären Endplatten. Sie besteht im wesentlichen aus drei Säule: effektive onkologische Therapie, symptomatische Therapie und gegebenenfalls Immunsuppression.

Der wichtigste Bestandteil bei der Therapie paraneoplastischer neurologischer Syndrome ist die rasche Detektion und suffiziente Behandlung des zugrunde liegenden Tumors. In einigen Fällen sind hierdurch die Symptome deutlich regredient. Bei einer Vielzahl der Patienten bessert sich die neurologische Symptomatik trotz suffizienter Tumortherapie und Immunsuppression nicht wesentlich. Grund dafür könnte eine bereits bei Diagnosestellung eingetretene irreversible Schädigung der Neurone sein.

Neben einer Reihe symptomatischer Therapieansätze, die von der neurologischen Symptomatik abhängig sind, besteht ebenso die Möglichkeit einer immunsuppressiven Therapie. Diese Therapie sollte jedoch mit Vorsicht eingesetzt werden und kann vermutlich nur in einigen wenigen paraneoplastischen Syndromen des ZNS die Erkrankung günstig beeinflussen (Graus et al., 1992; Uchuya et al., 1996, Rosenfeld et al., 2003). Bei der sensomotorischen Neuropathie, dem Lambert-Eaton Myasthenie Syndrom, Myasthenia gravis, Myositis, Neuromyotonie oder Stiffman-Syndrom ist eine Immuntherapie jedoch indiziert.

Die übrigen paraneoplastischen Syndrome, insbesondere die des zentralen Nervensystems profitieren meist von keiner der derzeit verfügbaren

immuntherapeutischen Optionen wie Protein A Absorption, Immunglobuline intravenös (ivIg), Cyclophosphamid oder Plasmapherese. In Einzelfällen konnten jedoch auch hier insbesondere bei paraneoplastischer limbischer Enzephalitis und paraneoplastischer Neuropathie deutliche Erfolge verzeichnet werden (Graus et al., 2001). Prinzipiell sollte zum frühestmöglichen Zeitpunkt eine Therapie angestrebt werden, da eine frühe Intervention die Erfolgsaussichten der Therapie deutlich erhöht (Keime-Guibert et al., 2000). Teilweise ist jedoch auch bei frühzeitiger Therapie, insbesondere bei einer PCD, ein schweres neurologisches Defizit zu erwarten, da die Erkrankung so schwer und akut verläuft, dass die Wirklatenz der vorhandenen Immunsuppressiva vermutlich zu lang ist, um eine irreversible, schwere neuronale Schädigung zu vermeiden (Rojas et al., 2000). Eine Tumorprogression unter Immuntherapie wurde entgegen der Befürchtungen bei der Mehrzahl der Patienten nicht beobachtet (Keime-Guibert et al., 1999, Albert et al., 2000).

### 1.1.8 Prognose

Aufgrund der offensichtlich effektiven Immunreaktion, die sowohl gegen den Tumor wie auch gegen neuronale Strukturen gerichtet ist, haben Tumorpatienten mit paraneoplastischem neurologischen Syndrom eine verlängerte Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten ohne Autoantikörper (Graus et al., 1997, Darnell et al., 1993). Dies gilt insbesondere für VGCC-Antikörper bzw. der anti-Hu Reaktivität bei Vorliegen eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Die Langzeitprognose bei mit einer anti-Yo-Reaktivität assoziierten gynäkologischen Tumoren ist hingegen relativ schlecht. So versterben etwa 50% der Patienten mit paraneoplastischen neurologischen Erkrankungen an den Folgen des Tumors, die andere Hälfte an den Folgen der neurologischen Erkrankung (Rojas et al., 2000).

Insgesamt bleiben die assoziierten Tumore jedoch eher, meist sogar mikroskopisch klein, wachsen weniger invasiv und metastasieren vergleichsweise selten. Dies ist vermutlich auf die verstärkte Infiltration dieser Tumore mit Lymphozyten und Plasmazellen zurückzuführen, die im Vergleich zu Tumoren ohne assoziierte paraneoplastische Erkrankung deutlich ausgeprägter ist.

Trotz der zum Teil deutlich verbesserten Tumorprognose resultiert aus der Immunreaktion, die ja auch gegen das Nervensystem gerichtet ist ein zum Teil sehr ausgeprägtes neurologisches Krankheitsbild, das sowohl Lebensqualität als auch Lebenserwartung der betroffenen Patienten deutlich einschränkt.

### **1.1.9 Antikörperreaktivitäten**

Tabelle 1 zeigt die wichtigsten bisher identifizierten anti-onkoneuronalen Antikörper, die mit paraneoplastischen Syndromen assoziiert sind. Diese Arbeit konzentriert sich auf zwei Antigene, die hier näher charakterisiert seien.

#### *Yo*

Anti-Yo Antikörper treten insbesondere in Assoziation mit gynäkologischen Tumoren wie Mamma-, Ovarial- und Zervixkarzinomen auf und reagieren spezifisch mit dem Tumor und dem Zytoplasma zerebellärer Purkinje-Zellen. Einzelfälle Yo-positiver männlicher Patienten mit Hodgkin Lymphomen und verschiedenen Adenokarzinomen sind in der Literatur beschrieben.

Das von den Seren der Patienten erkannte Antigen enthält in seinem N-terminalen Bereich eine erweiterte amphiphatische Leucin-Zipper Domäne (Fathalla-Shaykh et al., 1991). Dies, sowie seine Lokalisation im Zytoplasma bzw. den Nuklei der Neurone, lässt vermuten, dass die Funktion dieses Proteins in der Regulation der Gentranskription liegt.

Die Krankheit beginnt subakut und führt relativ rasch zu einer panzerebellären Dysfunktion, die als paraneoplastische zerebelläre Degeneration (PCD) bezeichnet wird. Betroffene Patienten leiden unter schwerster Stand- und Gangataxie, die meist so gravierend ist, dass die Patienten nicht mehr in der Lage sind, ohne Hilfe zu laufen oder zu stehen. Schwere Dysarthrie und Nystagmus gehören sehr häufig ebenso zur Symptomatik, Dysphagie, Diplopie und Schwindelsymptomatik sind ebenfalls beschrieben. Die Erkrankung manifestiert sich subakut innerhalb von Tagen bis Wochen und stabilisiert sich innerhalb der folgenden Wochen auf dem Niveau einer erheblichen Beeinträchtigung.

Pathologisches Korrelat dieser Erkrankung ist ein eindrucksvoller, da kompletter Untergang der zerebellären Purkinje-Zellen (Verschuuren et al., 1994). Für eine korrekte Funktion des Kleinhirns sind jedoch vermutlich mehr als 60% intakter Purkinje-Zellen nötig (Schmid et al., 1974). Zudem kann ein geringfügiger neuronaler Abbau in der Zona granulosa und den tiefen zerebellären Nuclei nachgewiesen werden, auch perivaskuläre Infiltrate des Kleinhirns sowie der Leptomeningen sind möglich. Diese können jedoch trotz eines totalen Verlustes der Purkinje-Zellen fehlen. Ursächlich hierfür ist vermutlich der Zeitverlauf der entzündlichen Reaktion, die in der Frühphase der Erkrankung sehr ausgeprägt, zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr nachzuweisen ist. Grund dafür ist vermutlich der Wegfall des Zielantigens nach Untergang sämtlicher Purkinje-Zellen und konsekutiv ein „Ausbrennen“ der Entzündung. Durch die Obduktion einer betroffenen Patientin im akuten Stadium der Erkrankung konnten hingegen deutliche Infiltrate bestehend aus CD8+ Lymphozyten sowie eine panzerebrale diffuse Aktivität von Mikroglia nachgewiesen werden. (Giometto et al., 1997). Die Infiltrate sowie der neuronale Verlust sind insbesondere in der Medulla sowie im Kleinhirn lokalisiert, jedoch in einem geringeren Ausmaß auch im Hirnstamm sowie im zerebralem Kortex zu detektieren. Interessanterweise können von Entzündung und neuronalem Schaden auch Strukturen betroffen sein, die kein Yo exprimieren, wie beispielsweise Tractus spinocerebellaris, Tractus coticospinalis und Tractus cuneatus (Verschuuren et al., 1996).

Die Hypothese einer T-Zell-vermittelten Immunantwort wird nicht zuletzt durch den Nachweis von MHC Klasse I und II auf den Neuronen und Purkinje-Zellen während der akuten Krankheitsphase gestützt

Die Prognose der neurologischen Erkrankung ist im Fall der paraneoplastischen Kleinhirndegeneration relativ schlecht. Weder spontan noch unter immunsuppressiver oder onkologischer Therapie ist eine nennenswerte Besserung der Symptomatik zu erwarten.

### *PNMA1*

Die anti-neuronalen Reaktivitäten gegen die Proteine der Ma-Familie sind erst relativ neu beschrieben (Dalmau et al., 1999), jedoch vergleichsweise häufig nachweisbar. Die Seren betroffener Patienten erkennen intraneuronal lokalisierte, nach der Indexpatientin „Margret“ benannten Ma-Proteine, das 39,8 kDa PNMA1 oder das 41,5 kDa PNMA2-Protein, deren Funktion bisher nicht sicher geklärt ist.

Eine Immunreaktivität gegen PNMA1 und PNMA2 ist in der Regel assoziiert mit paraneoplastischer Enzephalitis, die sich besonders ausgeprägt im limbischen System oder/und im Bereich des Kleinhirns und Hirnstamms manifestiert. Die alleinige Reaktivität gegen PNMA2 weist hochspezifisch auf einen Keimzelltumor, vor allem des Hodens hin und ist mit Störungen des limbischen und hypothalamischen Systems sowie der Kleinhirnfunktion assoziiert. Klinisch präsentieren die Patienten mit einer limbischen Enzephalitis komplexe neuropsychologische Störungen mit Unruhe, Depression, schweren kognitiven Defiziten, Demenz sowie Anfällen.

Eine zusätzliche Reaktivität gegen weitere Mitglieder der Ma-Proteinfamilie (PNMA1, PNMA3) beweist die paraneoplastische Ätiologie, ist jedoch nicht mit einem bestimmten Tumortyp assoziiert. Ein drittes Protein der Ma-Familie mit ebenfalls hoher Homologie ist mittlerweile beschrieben, ist jedoch immer mit dem Vorhandensein einer Ma2-Reaktivität assoziiert.

PNMA1 ist in allen Neuronen des peripheren und des zentralen Nervensystems exprimiert, wobei die Antikörper in den Patientenseren insbesondere nukleäre und nukleoläre Strukturen, weniger ausgeprägt zytoplasmatische Bezirke der Neurone anfärben. Mit der Ausnahme testikulärer Gewebe und hier insbesondere der Spermatozyten zeigten die Seren keinerlei Reaktivität mit nichtneuronalen Zellen.

Daten aus Autopsien und Biopsien bei Patienten mit einer Ma-Reaktivität zeigten Infiltrate, die sich insbesondere aus mononukleären Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zusammensetzten und in den Regionen des limbischen Systems, Hirnstamm, Kleinhirn und Basalganglien lokalisiert waren. Über mögliche immunpathologische Veränderungen in Hoden anti-Ma positiver Patienten existieren leider keine Daten, klinisch sind bisher keine Auffälligkeiten beobachtet worden.



Die gegen die Ma-Proteine gerichtete Immunreaktion unterscheidet sich jedoch von der, die gegen andere mit paraneoplastischen Syndromen assoziierten Proteine gerichtet. Bei keinem anderen paraneoplastischen neurologischen Syndrom existieren die Reaktivitäten gegen verschiedene Epitope sehr ähnlicher Proteine, die jeweils nicht von den Seren aller Patienten erkannt werden. Ein weiterer Punkt, der die Ma-Reaktivitäten zu anderen paraneoplastischen neurologischen Syndromen abgrenzt ist die Beobachtung, dass doch etwa 39% der Patienten eine Besserung oder ein Verschwinden der Symptomatik zeigen, wobei dies besonders bei Patienten mit zugrunde liegendem Hodentumor der Fall ist.

<b><i>Name</i></b>	<b><i>PND</i></b>	<b><i>häufigste Tumore</i></b>
<b>ANNA-3</b>	Neuropathie, PCD, PLE	SCLC
<b>Anti-Amphiphysin</b>	Stiffman-Syndrom, Enzephalitis	Mamma; SCLC
<b>Anti-CV2 (anti-CRMP5)</b>	Enzephalitis, PCD	SCLC, Thymom
<b>Anti-Hu (ANNA-1)</b>	Enzephalomyelitis, sensorische Neuropathie	SCLC, Neuroblastom
<b>Anti-Ma</b>	Rhombenzephalitis, PLE	Mamma, verschiedene
<b>Anti-Recoverin</b>	Retinopathie	Lunge
<b>Anti-Ri (ANNA-2)</b>	POMA	Mamma, Ovar, Zervix; SCLC
<b>Anti-Ta/Ma2</b>	PLE, Rhombenzephalitis	Hoden
<b>Anti-Titin</b>	Myasthenia gravis	Thymom
<b>Anti-Tr (PCA-Tr)</b>	PCD	M. Hodgkin
<b>Anti-Yo (PCA-1)</b>	PCD	Ovar, Mamma, Zervix
<b>PCA-2</b>	Enzephalitis, LEMS, Neuropathie	SCLC

**Tabelle 1: Klinisch relevante Antikörper-Reaktivitäten als Marker einer paraneoplastischen Ätiologie.**

PND = paraneoplastische neurologische Erkrankung; PCD = paraneoplastische Kleinhirndegeneration; PLE = paraneoplastische limbische Enzephalitis; POMA = paraneoplastisches Opsoklonus Myoklonus Ataxie Syndrom; LEMS = Lambert-Eaton Myasthenie-Syndrom; SCLC = kleinzelliges Bronchialkarzinom;

### 1.2 Ziel der Arbeit

Im Gegensatz zu paraneoplastischen neurologischen Erkrankungen, die die neuromuskuläre Synapse oder muskuläre Strukturen betreffen, bei denen die assoziierten Antikörper primär für die Pathogenese dieser Erkrankungen verantwortlich sind, ist die Ätiologie paraneoplastischer neurologischer Syndrome des ZNS nicht sicher geklärt. Trotz vieler Beobachtungen, die eine Autoimmunhypothese stützen, fehlen Daten, die diese Vermutung untermauern. Insbesondere ist nicht geklärt, welche Pathomechanismen zu der ausgeprägten neuronalen Degeneration führen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben unter Verwendung unterschiedlicher Methoden (s.o.) mehrfach versucht, ein Tiermodell zu etablieren, gelungen ist dies jedoch bisher nicht (Sillevis Smitt et al., 1995; Tanaka et al., 1994, Tanaka et al., 1995; Carpentier et al., 1998; Sakai et al., 2001; Auf et al., 2002, Graus et al., 1991). Verschiedene Erkenntnisse lassen Rückschlüsse auf eine Beteiligung von T-Zellen und anti-neuronalen Antikörpern zu. Da, wie in verschiedenen Studien gezeigt, eine Pathogenität dieser Autoantikörper als alleiniger Mechanismus dieser Erkrankungen wohl ausscheidet und sich die Hinweise auf eine krankheitsauslösende Rolle der T-Zellen zunehmend verdichten, ist es die logische Konsequenz ein Tiermodell zu etablieren, bei dem die T-Zell-Komponente ganz im Vordergrund steht. Ziel der Arbeit war es, eine CD4<sup>+</sup> Th1 T-Zelllinie gegen die beiden relevanten onkoneuronalen autologen Antigene rYo und rPnma1 zu etablieren und deren Pathogenität in der Ratte zu untersuchen. Dazu sollten zunächst erstmals die korrespondierenden Ratten-Antigene kloniert und exprimiert werden, anschließend die entsprechenden T-Zelllinien generiert, charakterisiert und transferiert werden. Das pathogene Potential dieser spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen sollte anschließend nach klinischen und histopathologischen Gesichtspunkten untersucht werden. Ein solches Tiermodell, das zeigen würde, dass spezifisch gegen ein neuronales Antigen reagierende T-Zellen in der Lage sind, neuronalen Schaden zu setzen, könnte als Quasi-Beweis für die Autoimmunpathogenese gewertet werden. Zudem könnte es

wertvolle Informationen für das Verständnis paraneoplastischer neurologischer Erkrankungen liefern.



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Versuchstiere**

Weibliche DA-, bzw. BN-Ratten im Alter von 6-8 Wochen aus Barriere-Haltung wurden bei Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Germany) bestellt, Lewis-Ratten aus der Tierzucht des Max-Planck-Instituts für Biochemie bezogen und nach konventionellen Methoden im Tierhaus des Max-Planck-Instituts für Neurobiologie gehalten.

#### **2.1.2 Kulturmedium für prokaryontische Zellen**

##### *LB-Medium*

Pepton aus Casein	10 g/l
Hefe Extrakt	5g/l
NaCl	5g/l

Nach Autoklavieren (120°C, 1 atü) und Abkühlen auf < 50° C wurden je nach enthaltenem Resistenzgen 100 mg/l Ampicillin und / oder 25 mg/l Kanamycin zugesetzt.

##### *LB-Agar Platten*

15 g/l Agar wurden in LB Medium autoklaviert und konnte so bei 4°C aufbewahrt werden. Vor Verwendung erfolgte eine Erhitzung in der Mikrowelle und die Zugabe der Antibiotika nach Abkühlung auf etwa 55°C. Die Platten wurden anschließend unter sterilen Bedingungen gegossen.

#### **2.1.3 Kulturmedien für eukaryontische Zellen**

Grundbestandteil der Medien war Dulbeccos Modifikation des Eagles Medium (DMEM), welches mit folgenden Zusätzen supplementiert wurde:

## 2 Material und Methoden

---

### *Eagles Hepes*

NaHCO <sub>3</sub>	45 mM (3.7 g/l)
HEPES	
(N-[2 Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulfonsäure])	25 mM (6 g/l)
sterilfiltrieren (0.22µm), bei 4°C aufbewahren	

### *DMEM/Asn*

NaHCO <sub>3</sub>	45 mM (3.7 g/l)
L-Asparagin	0,024 mM (36mg/l)
sterilfiltrieren (0.22µm), bei 4°C aufbewahren	

### *Komplettes DMEM*

DMEM/Asn	
Penicillin/Streptomycin	1%
Natriumpyruvat	1%
Nicht-essentielle Aas	1%
L-Glutamin	1%
0.4% (v/v) β-Mercaptoethanol	0.1%

### *Restimulationsmedium*

komplettes DMEM	
1% naives Rattenserum	
sterilfiltrieren (0,22 µm)	

### *TCGF (T cell growth factor)*

Komplettes DMEM	
hitzeinaktiviertes Pferdeserum	15%
MLA-Überstand (IL-2-haltig)	15%
sterilfiltrieren (0,22 µm)	

### *Einfriermedium*

EH	45%
Pferdeserum, hitzeinaktiviert (HS)	45%

DMSO (Dimethylsulfoxid) 10%

Erst wurde das Serum, anschließend das DMSO in EH sterilfiltriert (0,22µm); die maximale Aufbewahrungszeit sollte 10 Tage bei 4°C nicht überschreiten.

#### *Medium für MLA-Zellen*

Komplettes DMEM

Pferdeserum (hitzeinaktiviert) 15 %

Sterilfiltrieren (0,22 µm), maximal 14 Tage bei 4°C aufbewahren

#### *Hitzeinaktivierungen*

Hitzeinaktivierung von HS und FCS erfolgt für 40 min bei 56°C

#### *MLA-Überstand*

MLA-Überstand wurde durch Kultivierung der Gibbon-Lymphomzelllinie MLA 144 in komplettem DMEM mit 15% HS gewonnen (Chen et al., 1985). Diese Zelllinie besitzt ein in die 3'-untranslatierte Region des Il-2-Gens integriertes „Long terminal repeat Enhancer“-Element des Gibbon-Leukämievirus und synthetisiert konstitutiv Il-2.

### **2.1.4 (Allgemein) Puffer und Reagenzien**

#### *PBS*

NaCl 150 mmol/l

KCl 2.7 mmol/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.1 mmol/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mmol/l

pH 7.4

#### *Paraformaldehyd (PFA)*

PBS

4% Paraformaldehyd

pH 7.3

### *Harnstoffpuffer*

Harnstoff      6 mol/l  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>      0,1 mol/l  
NaCl            0,5 mol/l  
pH 8

### *Waschpuffer für Nickelsäule*

Harnstoffpuffer  
Imidazol 40 mmol/l  
pH >6

### *Elutionspuffer für Nickelsäule*

Harnstoffpuffer  
Imidazol 0.5 mol/l  
pH >6

### *Acetatpuffer*

Natriumacetat 20 mmol/l  
pH 3

### *TBS*

0,05 M Tris  
0,15 M NaCl  
pH 7,4

### *DEPC- H<sub>2</sub>O*

0,01% Diethylpyrocarbonat

## **2.1.5 Lösungen für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blotting:**

### *Bestandteile des Polyacrylamidgels*

Lösung A      30% (w/v) 16 g/l Acrylamid/Bisacrylamid  
Puffer B      1.5M Tris pH 8.8



Lösung C      10% Natriumlaurylsulfat (SDS)

Puffer D      0.5 M Tris pH 6.8

10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)

wassergesättigtes Butanol

*Laufpuffer*

3 g/l Tris

14.4 g/l Glycin

1 g/l SDS

*10 x Protein-Auftragspuffer*

0,4 M Tris/HCl, pH7.5

0.45 g/ml Glycerin

1 mg/ml Bromphenolblau

0.15 mg/ml SDS

1.5 M  $\beta$ -Mercaptoethanol

*Biotrap-Puffer (Protein)*

25 mmol/l Tris

192 mmol/l Glycin

0,025 % SDS

*Coomassie-Färbelösung*

2 g/l Coomassie Brilliant Blue R250

50% Methanol

7,53% Eisessig

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

*Coomassie-Entfärber*

40% Methanol

10% Eisessig

50% H<sub>2</sub>O

### *Transferpuffer für Westernblotting*

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20% Methanol  
0,1% SDS  
pH 8,3

### *Waschpuffer für Blot-Membran (TBS-T)*

0,05 M Tris  
0,15 M NaCl  
0,1% Tween 20  
pH 7,4

### **2.1.6 Lösungen für Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Lösungen des Protein Assay Kits wurden bei Sigma bezogen und gegebenenfalls nach Anleitung verdünnt

#### *Lowry-Reagenz Lösung*

1 Flasche Lowry Reagenz, modifiziert  
40 ml H<sub>2</sub>O bidest.  
stabil bei RT

#### *Folin & Ciocalteu's Phenolreagenz, Arbeitslösung*

18 ml Folin & Ciocalteu's Phenolreagenz  
90 ml H<sub>2</sub>O bidest  
in dunkler Flasche bei RT stabil

### **2.1.7 Puffer für DNA-Analysen**

#### *Ethidiumbromid-Lösung*

Ethidiumbromid 5mg/ml  
(bei RT unter Lichtabschluss gelagert)

*10 x TBE-Puffer*

Tris/HCl 0,9 mol/l (pH 6.8)

Borsäure 0,9 mol/l

EDTA 0,02 mol/l

pH 8,34

*DNA-Auftragspuffer*

Glycerin 50%

Bromphenolblau 0.25 %

**2.1.8 Puffer für ELISA**

*Auftragspuffer*

1.6g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

2.92 g/l NaHCO<sub>3</sub>

*OPD-Puffer*

24.3 mM Citrat

51.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,4 mg/ml Ortho-Phenyldiamin (OPD)

30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 µl / 50 ml)

*Stop-Lösung*

3 M Salzsäure

*Waschpuffer*

PBS

0.05% Tween

**2.1.9 Zytokin-ELISA**

Ratten-Zytokin-ELISA-Kits wurden bei Biosource oder Laboserv bezogen. Es wurden jeweils die im Kit enthaltenen Puffer verwendet und gegebenenfalls nach Anweisung verdünnt.

### 2.1.10 Puffer für FACS-Analyse

#### *FACS-Puffer*

2 % BSA (bovines Serumalbumin)

10 mM NaN<sub>3</sub> in PBS

Der letzte Waschschrift und die Analyse erfolgte in PBS oder PBS / NaN<sub>3</sub>.

Eine vollständige Liste aller verwendeten Chemikalien, Biochemikalien sowie der verwendeten Verbrauchsmaterialien befindet sich im Anhang.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von cDNA

#### *Organentnahme*

Für die Gewinnung von Ratten-RNA wurde eine naive, 8 Wochen alte, weibliche DA-Ratte mit Äther eingeschlüfert und rasch Thymus, Leber, Milz, Nieren, Lunge, Herz, Ovar, Nervus ischiadicus, Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm entnommen, in flüssigem Stickstoff rasch auf -80° C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur verwahrt.

#### *RNA-Gewinnung*

Arbeiten mit RNA verlangt die Verwendung hochreiner Reagenzien, da die ubiquitär vorhandenen RNAsen im Gegensatz zu den DNAsen äußerst stabil sind. Sie lassen sich durch Hitze nicht inaktivieren und benötigen zu ihrer Aktivierung keinerlei Kofaktoren. Um bereits vorhandene RNAsen zu inaktivieren wurde Diethylpyrocarbonat (DEPC) verwendet, das über kovalente Bindung insbesondere an Histidinreste das aktive Zentrum der RNAsen modifiziert. In vielen verwendeten Puffern zur RNA-Verarbeitung werden auch andere, jedoch weniger potente RNase-Inaktivatoren verwendet. Isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert, die Konzentration spektrometrisch (Gene Quant, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden) bestimmt.

### *Präparation von mRNA*

Aus den tiefgefrorenen Rattengeweben wurde mRNA mit Hilfe von Oligo-dT gekoppelte Magnetkugeln (Dynal, Hamburg, Germany) analog den Herstellerangaben isoliert. Die erhaltene mRNA wurde entweder sofort mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  verwahrt.

### *Herstellung von Ribonuklease-freiem Wasser*

Aqua bidestillata wurde mit 0.01% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges DEPC muss anschließend aufgrund seiner RNA-modifizierenden Eigenschaft über die Carbethoxylierung insbesondere von Adeninen aus den angesetzten Lösungen durch Autoklavieren entfernt werden. Dabei zerfällt es zu Kohlendioxid und Ethanol.

### *Reverse Transkription*

Die reverse Transkription dient dem Nachweis von mRNA-Expression. Die Methode ist so sensitiv, dass bereits ein einziges mRNA-Molekül in der Zelle nachgewiesen werden kann (Foley et al, 1993). Dabei wird die isolierte mRNA mit Hilfe von Oligo-dT-Primern in cDNA transkribiert. Man erhält Hybride aus cDNA und mRNA, die als Matrize für spezifische Amplifikationen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) dienen können. Für die reverse Transkription wurden 22  $\mu\text{l}$  mRNA aus der Dynal-Bead-Präparation mit 2  $\mu\text{l}$  Oligo(dT)-Primern (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (invitrogen) für 10 Minuten bei  $70^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach kurzer Abkühlung des Reaktionsgefäßes auf Eis wurde 8  $\mu\text{l}$  5x first strand Puffer (Gibco BRL, Schottland), 4  $\mu\text{l}$  DTT (Dithiothreitol, Gibco BRL, Schottland) und 2  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP-Mix (Qiagen, Hilden, Germany) zugegeben und 2 Minuten bei  $42^{\circ}\text{C}$  präinkubiert. Nach Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  des Reaktionsenzym Superscript (Gibco BRL, Schottland) fand die Transkription anschließend 60 Minuten bei  $42^{\circ}\text{C}$  statt. Das Enzym wurde anschließend für 15 Minuten bei  $70^{\circ}\text{C}$  inaktiviert. Die erhaltene cDNA konnte nun unter Verwendung von 1  $\mu\text{l}$  dieser Lösung pro 50  $\mu\text{l}$  Gesamtansatz für die folgenden PCR-Reaktionen eingesetzt werden. Die cDNA wurde kurzfristig bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , mittelfristig bei  $-80^{\circ}\text{C}$  verwahrt.

### 2.2.2 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Diese Methode erlaubt es, bestimmte Nucleotidsequenzen enzymatisch millionenfach zu amplifizieren und sie so einer weiteren Analyse zugänglich zu machen. Zunächst wird die doppelsträngig vorliegende cDNA bei einer Temperatur von 95° C denaturiert, an die nun einzelsträngig vorliegende cDNA hybridisieren im zweiten Schritt die im Überschuss zugegebenen Oligonukleotid-Primer bei Temperaturen von ca. 50-60°C. Die Höhe der Temperatur ist von der Primerzusammensetzung abhängig und korreliert positiv mit der Spezifität und negativ mit der Sensitivität. Ausgehend von den Primern synthetisiert im letzten Schritt die DNA-Polymerase bei der angegebenen Arbeitstemperatur des verwendeten Enzyms von 3' nach 5' durch Anlagerung der ebenfalls zugegebenen Nukleotide einen komplementären Strang. Durch mehrfache (etwa 30-35 mal) Wiederholung dieses Zyklus erfolgt eine exponentielle Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz. Für die vorliegende Arbeit wurden im wesentlichen zwei DNA-Polymerasen verwendet. Zum einen die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, deren maximales Aktivitätsspektrum bei 72 °C liegt. Ihr Nachteil liegt in einer relativ hohen Fehlerquote, so dass für PCR-Reaktionen im Rahmen einer Klonierung das exakter arbeitende Enzym Herculase verwendet wurde. Alternativ wurde die PCR mit anschließender Klonierung mehrfach wiederholt, um Fehler auszuschließen. PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel analysiert. Neben den Proben wurde immer eine Negativkontrolle ohne DNA durchgeführt.

Durchgeführt wurden die Reaktionen in Ansätzen à 50µl in 200µl PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym) in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany).

1 µg cDNA wurde in 50 µl mit folgenden Zusätzen amplifiziert:

10 x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden, Germany)

0.2 µM je Primer (Metabion, Martinsried, Germany;)

200 µM je dNTP (Qiagen, Hilden, Germany)

1 U Taq (Qiagen, Hilden, Germany)

Es wurden folgende Primer bei Metabion (Martinsried, Germany) bestellt:

β-Actin:	5'- TGC TAG GAG CCA GGG CAG TTA TC -3'
	5'- TAC AAT GAG CTG CGT GTG GCC -3
Ma1 i2 sense:	5'-TGC GAT GCC CCA GGT CTC C-3'
Ma1 antisense:	5'-CGG ATC TGC ACC AGC AAC TGA AAG AGG-3'
Ma1 gw ii prox:	5'-AGA GCC CTC CTT TGC CTG GCA TCT CC-3'
Ma1 gw ii dist:	5'-TTC CAA AAA CTC CGC GTC GGA AGT GG-3'
Ma1 gw 3' i1:	5'-TCT GCT GCA AAA GGT AGT GGA CAA GG-3'
Ma1 gw 3' i2:	5'-ATA ACG TGA ACC AGG CTC GCC TGG AAC AGG-3'
Ma1 5'	5'-GCT ATG ACA CTA TTG GAA GAC TGG TGC -3'
Ma1 3'	5'-GAA GTG CCC CTC TAG GCC TAG CTG C-3'
Ma1 pQE60 5' (Nco I)	5'-CAT GCC ATG GCT ATG ACA CTA TTG GAA GAC TGG-3'
Ma1 pQE60 3' (Bgl II)	5'-ATA GAT CTG AAG TGC CCC TCT AGG CCT AGC TGC-3'

Es wurden etwa folgende Fragmentgrößen erwartet:

β-Actin	700 bp
rPnma1	1000bp
rYo	1500bp

Folgendes Standardprogramm wurde je nach erwartetem Fragment und Schmelztemperatur der verwendeten Primer modifiziert:

Denaturierung	5 Min	95°C
30-35 Zyklen		
	1 Min	95°C
	1 Min	60°C
	1 Min	72°C
Anschließend einmalig		
10 Min		72°C

### *Genome walk PCR*

Um die 5' und 3'-Enden der mit humanen Primern besetzten Fragmente von rYo und rPnma1 bestimmen zu können wurde ein „genome walk“ mit einem Ratten genome walker kit (Clontech, California, USA) analog den Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden anhand der bereits erhaltenen Rattensequenz spezifische Primer generiert und mit den mitgelieferten Primern auf der dazugehörigen, in verschiedene Banken partitionierten, gesamten genomischen DNA der Ratte eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die erhaltenen Produkte konnten sequenziert werden und komplettierten die Sequenz der jeweiligen Ratten-Proteine.

### *Primer-Design*

Die initialen Primer für rPnma1 wurden anhand der humanen Sequenz entwickelt, die für rYo anhand der bereits publizierten Maus-Yo-Sequenz. Für die Generierung der Primer wurden folgende Grundsätze beachtet:

Die Primer waren 18-30 Basenpaare lang und wurden vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende hergestellt. Regionen, die aufgrund ihrer Korrespondenz zu anderen Regionen innerhalb des Primers oder des zweiten in der Reaktion verwendeten Primers zu Dimerbildung prädisponierten, wurden nach Möglichkeit vermieden. Die Schmelztemperatur wurde für beide Primer ähnlich hoch gewählt und bewegte sich im Bereich zwischen 56-66°C. Approximativ konnte sie anhand der Anzahl und Art der im Primer enthaltenen Nukleotide berechnet werden. Für jedes Guanin und Cytosin wurden 4°C, für jedes Adenosin und Thyminid jeweils 2°C veranschlagt und addiert, anschließend von dieser Temperatur noch mal 4°C subtrahiert.

Die Primer wurden anschließend von der Firma Metabion (Martinsried, Germany) synthetisiert.

### *Analyse der PCR-Produkte auf Agarosegelen*

Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese analysiert. Dabei nutzt man die Tatsache, dass Nukleinsäuren durch das Ribosephosphatrückgrat gleichmäßig verteilte negative Ladungen tragen und doppelsträngige, lineare DNA eine relativ



konstante Struktur hat. Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode, und zwar umso langsamer, je größer sie sind. Dabei haben die Agarosegele eine Art Sieb-Funktion und lassen kleinere Moleküle schneller, größere Fragmente langsamer passieren. Je höher konzentriert die Agarose eingesetzt wird, desto feiner wird das Sieb und desto genauer wird die Auftrennung. In der vorliegenden Arbeit wurden meist 1% Agarosegele verwendet. Dazu wurde pro gegossenem Gel 1 % Agarose (Biozym, Oldendorf, Germany) in 40 ml Tris-Borat-Puffer (TBE) aufgekocht, mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versehen und in eine PCR-Kammer mit dem gewünschten Kamm gegossen. Nach dem Festwerden der Gele wurden diese mit TBE-Laufpuffer überschichtet und je 9 µl der Proben mit 1 µl Auftragspuffer in die Taschen, zudem 3 µl des Größenstandards G200 Leiter (Geneo, Hamburg, Germany) in eine Vergleichsspur gegeben. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte etwa eine Stunde bei 100 V. Anschließend konnten die DNA-Fragmente aufgrund der stattgefundenen Interkalation des Ethidiumbromids im UV-Licht visualisiert und photographiert werden (Image Master, Pharmacia Biotech).

### *Konzentrationsbestimmungen von RNA und cDNA.*

Für Konzentrationsbestimmungen wurde mRNA und cDNA 1:70 in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnt und im Photometer (Gene Quant II, Pharmacia) vermessen. Dabei wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt, was dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bzw. Proteinen entspricht. Der Quotient der Werte bei 260 nm zu denen bei 280 nm kann zur Bestimmung der Reinheit der DNA bzw. der RNA verwendet werden und sollte in jedem Fall über 1,7 liegen. Sehr saubere DNA Lösung erreicht Werte zwischen 1,8 und 1,95, besonders reine RNA Werte zwischen 1,9 und 2,0. In einer 1 cm dicken Küvette entspricht bei einer Absorption von 260 nm eine optische Dichte von 1 etwa 50 µg/ml für doppelsträngige Nukleinsäuren und 37 µg/ml für einzelsträngige Nukleinsäuren. Aus der optischen Dichte konnte also die Konzentration berechnet werden.

### *Reinigung der PCR-Produkte*

Um die erhaltenen PCR-Produkte für die anschließende Sequenzierreaktion von Primern, Nukleotiden, der Polymerase und Salzen zu befreien wurden sie über den QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) analog den Herstellerangaben unter Benutzung einer Mikrozentrifuge über kleine Säulchen aufgereinigt.

### *Extraktion der PCR-Produkte aus Agarosegelen*

Waren auf dem Agarosegel mehrere Fragmente zu sehen, jedoch nur eines gewünscht, konnte die Bande der richtigen Größe aus einem präparativen Agarosegel extrahiert werden. Dazu wurde das PCR-Produkt unter der UV-Lampe visualisiert, mit einem Skalpell sauber ausgeschnitten und anschließend unter Verwendung des QIAquick Gel Extraktions- Kit (Qiagen, Hilden, Germany) aus dem Gel eluiert. Es wurde nach Herstellerangaben analog dem Protokoll für eine Mikrozentrifuge verfahren.

### *Sequenzierung der PCR-Produkte*

Die gereinigten PCR-Produkte wurden vermessen, die Sequenzierreaktionen anschließend mit den gewünschten Sequenzierungsprimern von den Firmen Toplab (Martinsried, Germany) oder Sequiserve (Vaterstetten, Germany) durchgeführt.

### **2.2.3 Klonierung in einen Expressionsvektor**

Für die Klonierung in den gewünschten Expressionsvektor pQE60 (Qiagen, Hilden, Germany) wurde zunächst über eine bzw. mehrere weitere PCR-Reaktionen an die für die rYo bzw. rPnma1 kodierenden Nukleotide die entsprechenden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NcoI, BglII (New England Biolab, Frankfurt, Germany) inklusive der vom Hersteller des jeweiligen Restriktionsenzym empfohlenen zusätzlichen Nukleotide angehängt. Anschließend wurde unter Zugabe der entsprechenden Restriktionsenzyme in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer ein Restriktionsverdau durchgeführt, der nun das DNA-Fragment für die anschließende Ligation in den Vektor an den definierten Erkennungsstellen aufschneidet. Um 1 µg DNA zu verdauen wurde je 1-5 U der entsprechenden Restriktionsenzyme verwendet.

Das Reaktionsvolumen wurde dabei so gewählt, dass der Anteil des Enzyms am Gesamtvolumen 10% nicht überschreitet, da das enthaltene Glycerol die Spezifität negativ beeinflussen bzw. die Reaktion hemmen kann. Verdaut wurde, sofern vom Hersteller nicht anders angegeben für 2h bei 37°C.

### *Präparation von Plasmidvektoren*

Da der Vektor für die Ligation in linearer Form benötigt wird wurden pro Ansatz 500 ng Plasmid-DNA simultan mit den beiden gewünschten Restriktionsenzymen in den angegebenen Puffern verdaut und mittels PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden, Germany) von Restriktionsenzymen und abgeschnittenen DNA-Fragmenten befreit. Eine Religation des linearisierten Vektors konnte durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase, die eine Phosphatgruppe am 5'-Ende der DNA abspaltet, minimiert werden. Dazu wurde der gereinigte Vektor mit 1 µl Shrimps Alkalischer Phosphatase (USB) etwa eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend erneut gereinigt. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde auf einem Agarosegel überprüft.

### *Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren*

Das Prinzip der Ligation ist die kovalente Verknüpfung der 3' und 5'-Enden verschiedener DNA-Stränge. Die DNA-Konzentration von einzufügendem DNA-Fragment und geschnittenem Vektor wurde photometrisch bestimmt und bei einem Volumen des Ligationsansatz von 50 µl mit einer gesamt DNA Menge von 500 ng das Verhältnis Vektor zu einzufügendem DNA-Fragment etwa 1:4 gewählt. Pro Ligationsansatz wurde 1U T4-DNA-Ligase (Böhringer, Mannheim) mit dem entsprechenden Ligasepuffer zu der DNA-Mischung addiert, das Restvolumen mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und 2h bei Raumtemperatur, alternativ bei 16°C über Nacht inkubiert. Zu jeder Ligation wurde eine Negativkontrolle angesetzt, bei der der linearisierte, dephosphorylierte Vektor ohne Insert mit Ligase behandelt wurde.

### *Hitzeschocktransformation von Bakterienzellen*

Der gesamte Ligationsansatz wurde mit 100 µl des kompetenten E. coli-Stammes DH5αFiq vermischt und 10 Minuten auf Eis vorinkubiert. Der Ansatz wurde nun für 2 Minuten bei 42°C, dann 30 Minuten wiederum auf Eis inkubiert. Nun wurde 800 µl

LB-Medium zugegeben, vorsichtig gemischt und 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf eine LB-Platte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die so gewonnenen Zellklone konnten nun weiterverarbeitet werden.

### *Herstellung elektrokompetenter Zellen*

Für die Expansion des elektrokompetenten E. coli-Stammes DH5 $\alpha$ Fiq wurde aus dem Glycerolstock 10 ml LB-Medium mit den Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen in 1 l frisches LB-Medium überführt und unter regelmäßiger photometrischer Kontrolle bis zu einer OD von 0,5-0,6 bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Kolben für 15-30 Minuten auf Eis abgekühlt und die Bakterien bei 4200 rpm und 4°C 15 Minuten in sterilen Zentrifugationsbechern pelletiert. Das Pellet wurde nun in 1l sterilem, eiskaltem H<sub>2</sub>O + 10% Glycerin resuspendiert und erneut unter identischen Bedingungen zentrifugiert. Dieses Pellet wurde nun noch weitere dreimal in H<sub>2</sub>O + 10% Glycerin aufgenommen, zunächst in 500 ml, nach einer weiteren Zentrifugation in 20 ml, zuletzt in 2 ml. Diese Suspension wurde in Aliquots von 50  $\mu$ l auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff heruntergekühlt und bei -80°C gelagert.

### *Elektrotransfektion von Bakterienzellen*

Die Applikation eines elektrischen Feldes bewirkt das kurzfristige Aufreißen der Zellmembran und erlaubt es der anwesenden Plasmid-DNA in die Zelle zu gelangen. Die geschnittene DNA wird anschließend in das Genom integriert. Dazu wurden 50  $\mu$ l elektrokompetente Zellen des Stammes DH5 $\alpha$ Fiq vorsichtig auf Eis aufgetaut, mit 2  $\mu$ l Ligationsansatz vermengt und anschließend möglichst luftfrei in eine Elektroküvette (Gene Pulser Cuvette, Biorad) gefüllt. Bei 25  $\mu$ F und 200 Ohm wurde in einem Gen-Pulser für Prokaryonten (Biorad) für einige Sekunden eine Spannung von 2,5 V angelegt. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium eine Stunde bei 37°C geschüttelt, kurz pelletiert und auf einer LB-Platte mit Ampicillin und Kanamycin ausplattiert. Diese wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und die am Folgetag gewachsenen Klone mittels Kolonie-PCR analysiert.

### *Kolonie-PCR*

Dazu wurde mit einer sterilen Pipettenspitze je ein Klon gepickt und in jeweils 41  $\mu$ l PCR-H<sub>2</sub>O ausgewaschen. Diesem H<sub>2</sub>O wurde dann pro 50  $\mu$ l Ansatz 5  $\mu$ l 10xPuffer (Qiagen), 1  $\mu$ l NTP Mix (Qiagen), sowie jeweils 1  $\mu$ l des Vorwärts- sowie des Rückwärts-Primer (20 pMol; Metabion, Martinsried, Germany) und 0,5  $\mu$ l Taq-Polymerase zugegeben. Dieser Ansatz wurde unter den bereits beschriebenen Bedingungen im PCR-Block inkubiert und anschließend auf einem 1% Agarose-Gel analysiert. Das Plasmid der positiven Klonen wurde anschließend mittels Miniprep isoliert.

### *Minipreps*

Aus einer definierten Anzahl der auf der LB-Platte gewachsenen und in der Kolonie-PCR positiven Klone wurden das Plasmid über eine Miniprep isoliert, anschließend mittels Restriktionsverdau analysiert und gegebenenfalls sequenziert. Hierfür wurden pro gewünschten Klon jeweils 5 ml Übernachtskultur in LB-Medium plus Ampicillin (100  $\mu$ g/ml, Sigma, St. Louis USA) generiert und am nächsten Morgen für vier Minuten bei 4000 rpm pelletiert. Anschließend wurde das Plasmid mit dem QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) streng nach Herstellerprotokoll isoliert.

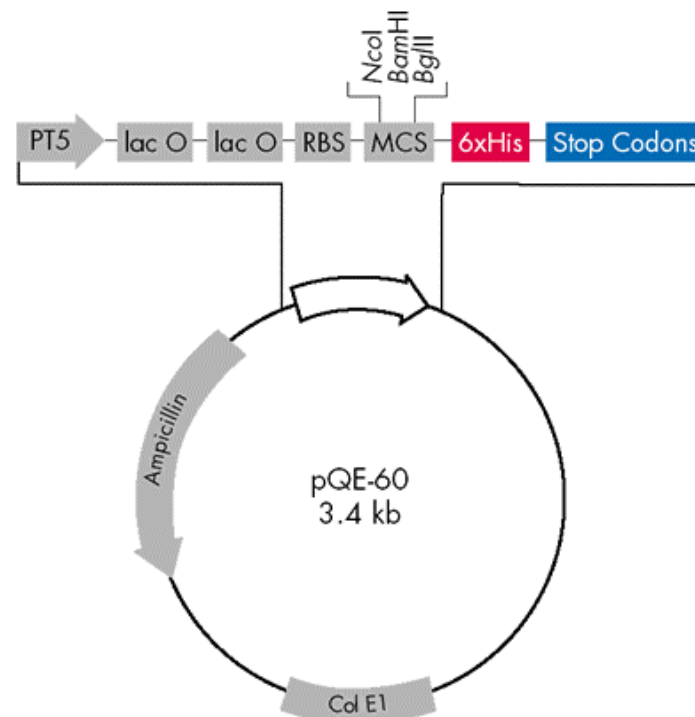
Um zu überprüfen, ob das aus einem Zellklon isolierte Plasmid auch das gewünschte Insert enthielt wurde dieses im Anschluss an die Miniprep mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und auf einem Agarosegel analysiert. Das Plasmid aus dem später gewählten Klon wurde anschließend noch sequenziert, um die korrekte Lage des Inserts in Leserichtung zu bestätigen.

## **2.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.3.1 Aufreinigung von rekombinantem Protein**

Exprimiert wurden die Proteine in dem E.coli-Stamm DH5 $\alpha$ Fiq, der den Expressionsvektor mit der DNA-Sequenz enthält, die für das gewünschte Protein kodiert. Das Fiq reguliert den Lac Promotor und enthält auf dem Episom eine Kanamycin-Resistenz. Für rYo und rMa1 wurde der Vektor pQE60 (Qiagen, siehe

Abbildung 1) verwendet. Dieser enthält neben einem Gen, das für eine Resistenz gegen Ampicillin kodiert einen mittels Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid induzierbaren und durch Glucose hemmbaren lac-Repressor, der die Expression des jeweiligen Proteins reguliert. Zudem enthält das rekombinante Protein am Carboxyterminus einen Polyhistidinrest, der eine Isolierung über eine immobilisierte Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie ermöglicht.



**Abbildung 1: Expressionsvektor pQE60**

**PT5:** T5 Promotor; **lac O:** lac Operator; **RBS:** Ribosomen Bindungsstelle; **ATG:** Startcodon; **6xHis:** 6xHis-Tag-Sequenz **MCS:** Multiple cloning site **Col E1:** Col E1 Ursprung der Replikation; **Ampicillin:** Ampicillin-Resistenzgen

### *Übernachtkultur*

1.21 sterilem LB-Medium wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml sowie Kanamycin in einer Dosierung von 25  $\mu$ g/ml zugegeben. Anschließend wurde

es mit 200 µl der jeweiligen Glycerinkultur bzw. Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt

### *Induktion*

Je 200 ml dieser Kultur wurden am nächsten Tag in 6 x 2 l frisches LB-Medium transferiert, dem wiederum 100 µg/ml Ampicillin sowie 25 µg/ml Kanamycin zugefügt wurde. Diese Kultur wurde unter photometrischer Kontrolle der Bakteriendichte bei 600 nm (Photometer Gene Quant Pro, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bei 37°C geschüttelt. Die Expression des jeweiligen Proteins wurde in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien, d.h. bei einer OD von 0.5-0.7 durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid induziert. Vier Stunden nach Induktion wurden die Bakterien mittels 20 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm geerntet. Um Medienreste zu entfernen wurde das erhaltene Bakterienpellet mit 200 ml PBS gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde nun, sofern es nicht sofort verarbeitet werden konnte, bei -20°C eingefroren.

### *Zellaufschluss*

Das Pellet wurde aufgetaut, in 200 ml PBS resuspendiert und etwa 30 min auf Eis im Sonicator (Branson Sonifier 450, 50%, output 8) ultrabeschallt, um die Bakterienzellwand zu zerstören. Da alle verwendeten rekombinanten Proteine in PBS nicht in Lösung gehen, konnte durch anschließende Zentrifugation (25000 rpm, 4°C, 60 min) in der Ultrazentrifuge die löslichen Bestandteile abgetrennt, verworfen und somit bereits eine gewisse Vorreinigung erzielt werden (siehe Abbildung 11). Das Pellet wurde nun in 200 ml 6 M Harnstoffpuffer pH 8 aufgenommen, unter gleichen Bedingungen erneut beschallt und zentrifugiert. Bei diesem Schritt ging der größte Teil aller verwendeten rekombinanten Proteine in Lösung, so dass der Überstand für den Auftrag auf die Nickel-Säule verwahrt wurde. Das Pellet wurde nun in 100 ml 8 M Harnstoffpuffer aufgenommen, wiederum beschallt und zentrifugiert, um die restlichen ungelösten Zellbestandteile abzutrennen. Dieser klare Überstand wurde mit

dem aus der zweiten Beschallung gepoolt und zum Auftrag auf die Nickelsäule verwendet.

### *Nickel-Chelat-Chromatographie*

Diese Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen matrixgebundenen Bindungspartner. Das  $\text{Ni}^{2+}$  wird am Säulenmaterial immobilisiert, wobei zwei freie Koordinationsstellen des Metalls für eine spezifische Interaktion mit basischen Gruppen von Proteinen, in diesem Fall dem C-terminalen Polyhistidinrest zur Verfügung stehen. So kann das rekombinante Protein auf der Säule zurückgehalten werden, wogegen andere Proteine heruntergewaschen werden. Da die Bindung bei dieser Methode nicht ganz so selektiv ist, wie die bei anderen Affinitätschromatographien werden die gebundenen Moleküle mittels Gradientenelution voneinander getrennt. Dafür wurde ein Puffer mit steigender Konzentration von Imidazol verwendet, das als funktionelle Gruppe des Histidins mit dem gebundenen Histidin um die Bindungsplätze mit dem Metall kompetitiert.

Zunächst wurde das Säulenmaterial (Chelating Sepharose Fast Flow, Amersham Pharmacia) in eine Säule eingebracht und mit drei Säulenvolumina  $\text{H}_2\text{O}$  dest gewaschen. Anschließend wurde sie durch Aufbringen von drei Säulenvolumina 1%  $\text{NiCl}$  mit dem Metall beladen und mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest (drei Säulenvolumina) gewaschen. Nach Äquilibrierung der Säule mit drei Säulenvolumina 6 M Harnstoffpuffer pH 8 konnten die gewünschten Überstände aus der Beschallung aufgetragen werden. Dies und die weiteren Schritte erfolgten mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 ml/min (Econo System, Biorad), alle Schritte wurden mittels UV-Detektion bei 280 nm verfolgt. Anschließend wurde mit 100 ml 6 M Harnstoffpuffer pH 8, später mit 500 ml Harnstoffpuffer + 40 mM Imidazol gewaschen. Eluiert wurde mittels Gradient der über 200 ml von 40 mM bis 500 mM Imidazol linear gepumpt wurde. In Fraktionen zu je 4 ml wurde das Eluat gesammelt und auf SDS-Gelen analysiert, ebenso wie die Überstände aus den Beschallungen und die Durchläufe sowohl des Protein-Auftrages als auch der Waschschrte.



### *Reinigung über Inclusion Bodies*

Wie sehr viele überexprimierende fremde Proteine klonierter Gene in heterologen Wirten wie den *E. coli* lagen nach der Induktion auch rYo und rMa1 in Inclusion bodies vor. Über eine Isolierung dieser Einschlusskörper kann eine sehr hohe Reinheit (>75 %) des Proteins bereits vor dem Auftragen auf die Nickel-Säule erreicht werden. Das aus gewaschenen Einschlusskörpern isolierte aggregierte Protein besteht aus denaturierten mono- und oligomeren Formen des Proteins, die über Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Für die Isolation der Einschlusskörper wurde, wie bereits beschrieben, 12 l induzierte rYo- bzw. rMa-Kultur pelletiert, in 100 ml 2 x PBS gewaschen und erneut pelletiert. Auf dieses Pellet wurde nun 100 ml 2 x PBS, eine große Messerspitze Lysozym und eine kleine Messerspitze DNase gegeben, der pH gemessen und etwa 20 min bei Raumtemperatur rotiert. Danach wurde die Suspension in ein Rosettenglas überführt und 3 x 5min auf Eis sonifiziert (Branson, Makrotip Stufe 8, Output 40%). Anschließend wurde bei 20000 rpm 20 min bei 4° C in einem SS-34-Rotor zentrifugiert und das Pellet in 60 ml Potterpuffer (2xPBS mit 0,5% LDAO (30%ig N,N-Dimethyldodallylamin-N-oxid) resuspendiert. Insgesamt wurde dreimal gepottert und anschließend unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. LDAO hat in diesem Zusammenhang exzellente Eigenschaften bezüglich der Lösung von Verunreinigungen ohne jedoch echte Inclusion bodies aufzulösen. Um das LDAO anschließend auszuwaschen wurde noch zwei zusätzliche Potter und Zentrifugationsschritte in 2 x PBS durchgeführt. Anschließend wurde das Pellet in etwa 30 ml Solubilisierungspuffer (6 M Gua + 20 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) gelöst, 1:10 mit 6 M Gua verdünnt und analog zu dem oben beschriebenen Protokoll auf die Nickelsäule aufgetragen. Dabei erfolgte die Equilibrierung der Säule mit 6 M Guanidinhydrochlorid, das Waschen mit 6 M Guanidinhydrochlorid + 40 mM Imidazol und die Elution mit 6 M Guanidinhydrochlorid + 0,5 M Imidazol. Anschließend wurde 48 h gegen 20 mM Na-Acetat-Puffer (pH 3) dialysiert.

### *Mini Ni Spin Kit*

Um den am besten exprimierenden Klon zu identifizieren wurden alle Klone vergleichend mit dem Ni-NTA-Spin Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben analysiert. Die Eluate wurden auf einem SDS-Gel vergleichend aufgetragen und der beste Klon selektiert.

### *Reinigung von Proteinen mit präparativen denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen*

Diese Methode wurde verwendet, um das Protein nach der Nickelsäulenaufreinigung einem additionalen Reinigungsschritt zu unterziehen, falls durch die Chromatographie alleine keine suffiziente Reinheit erzielt werden konnte. Für den präparativen Ansatz wurden Gele der Größe 16 cm x 20 cm x 2 mm gegossen, die sich aus einem 15 %igen Trenngel und einem 4 % Sammelgel zusammensetzten (2.3.5.). Nachdem das Gel polymerisiert war wurde es in eine vertikale Gelapparatur eingespannt und 60 Minuten mit 250 V vorelektrophoretisiert, um das Gel zu erwärmen. Die Proteinprobe wurde in 10x Auftragspuffer für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Damit die Probe zunächst schnell in das Gel einlaufen konnte wurde zunächst für 30 Minuten eine Spannung von 200-250 V angelegt, anschließend erfolgte die weitere elektrophoretische Auftrennung bei 70 V über Nacht. An der Lauffront aus Bromphenolblau konnte der Progress der Auftrennung verfolgt und bei Erreichen der Geluntergrenze gestoppt werden. Anschließend wurde die Proteinauftrennung mittels fünfminütiger Färbung mit ZnCl<sub>2</sub>-Lösung sichtbar gemacht. Zn<sup>2+</sup> bildet mit dem negativ geladenen SDS Komplexe, die das Gel milchig anfärben. An den Stellen im Gel, an denen sich Protein befindet schreitet der Komplexbildungsprozess so langsam voran, dass proteinhaltige Stellen initial klar erscheinen. So kann die gewünschte Bande anhand des mitgelaufenen vorgefärbten Größenmarkers (Prestained SDS-PAGE standard low range, Biorad) identifiziert und mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten werden. Das Protein kann anschließend im Gel bei -20°C eingefroren oder sofort eluiert werden.

### *Elektroelution von Proteinen mit dem „Biotrap“ Elektroseparationssystem*

Zur Isolierung des ausgeschnittenen Proteins aus dem SDS-Gel wurde dieses in ein mit verschiedenen Membranen bestücktes Kammersystem (Biotrap, Schleicher & Schüll) gelegt. Die Proteine folgen dem Strom in eine Sammelkammer, deren Eingang mit einer für Protein permeablen, die Ausgänge jedoch mit nichtpermeablen Membranen verschlossen werden, so dass das Protein in dieser Kammer kumulierte. Das Kammersystem wurde mit Biotrap-Puffer für Proteine befüllt und über Nacht bei einer Spannung von 90 V und anschließend weitere zwei Stunden bei 200 V eluiert. Durch die kurze Umkehr der Stromrichtung für 20 Sekunden nach Ende der Elutionszeit konnte an der Membran haftendes Protein von dieser entfernt und mit der restlichen Proteinlösung aus der Kammer pipettiert werden. Um das immer noch enthaltene SDS zu entfernen wurde die Proteinlösung anschließend mit Methanol gefällt.

### *Methanol-Präzipitation von Proteinen*

Die Methanolfällung dient zur Entfernung von Detergentien und Lipiden aus Proteinlösungen. Dazu wird zu der Proteinlösung mit der vierfachen Menge Methanol, 1 n Chloroform und 3 n H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gemischt und bei 9000 x g fünf Minuten zentrifugiert. Das Protein ist nun als weißer Niederschlag in der Interphase zu sehen und sollte bei der anschließenden Entfernung der hydrophoben und der hydrophilen Phase sorgfältig geschont werden. Das Protein wurde nun jeweils zweimal mit der 3-4 fachen Menge des Ausgangsvolumens mit Methanol gemischt und bei 9000 x g 10 Minuten pelletiert. Nach wiederum vorsichtiger Entfernung des Überstandes wurde das Protein 5-10 Minuten in der Sterilbank getrocknet und in einem gewünschten Volumen und Puffer aufgenommen.

### **2.3.2 Western-Blotting**

Nach elektrophoretischer Größenauftrennung der Proteine im SDS-Page können diese mittels einem senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feld aus dem Gel eluiert, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Dort ist eine Immundetektion individueller Proteine möglich. Diese erfolgt mit Hilfe eines Antiserums bzw. mit

einem Antikörper, der bestimmte Strukturen des Proteins erkennt und anschließender Anfärbung mit der indirekten Immunperoxidase-Methode. Zur späteren Identifizierung der Größe des angefärbten Proteins wurden bei der Proteinauftrennung in der SDS-PAGE jeweils 2 µl eines vorgefärbten Größenstandards (Prestained SDS-PAGE standard low range, Biorad) in eine Vergleichsspur gegeben. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge zusammengebaut: Kathode - weiße Kammerseite – Schwamm – Whatman Papier – Membran (Amersham Hybond) – Gel - Whatman Papier– Schwamm – dunkle Kammerseite – Anode. Die Zugabe eines vertikalen Eisblocks samt Rührfisch sorgt für effektive Umwälzung des Blotpuffers und vermeidet Überhitzung. Geblottet wurde 60 min bei 100 V.

Um die Membran zu neutralisieren und unspezifische Bindungsstellen zu besetzen wurde zunächst in 50 ml TBS + 5% Milchpulver für mindestens 1h bei Raumtemperatur, alternativ über Nacht bei 4°C geblockt. Nach Entfernung des Blockpuffers durch Waschen mit TBST wurde die Membran mit 20 ml TBS + 3% Milchpulver + Primärantikörper (monoklonaler Anti-Polyhistidin, Sigma Verdünnung 1:1000) für mindestens 1h inkubiert. Nach erneutem gründlichen Waschen mit TBST wurde der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper (goat anti-mouse, Dianova, Hamburg, Germany), verdünnt 1:5000 in 20 ml TBS + 3% Milchpulver zugegeben, etwa eine Stunde belassen und anschließend die bis dahin nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges jeweils fünfminütiges Waschen mit TBST entfernt. Detektiert wurde nun durch 60 Sekunden dauernde Inkubation mit je 3 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 (Amersham Pharmacia).

Das ECL-System (Enhanced Chemoluminescence) ist eine äußerst sensitive Methode zum Nachweis spezifischer, Antikörper-gebundener Antigene. Dieser beruht auf einer Oxidation von Luminol durch das Enzym Peroxidase unter alkalischen Bedingungen und unter Katalyse mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Luminol befindet sich nun in einem höherenergetischen, angeregtem Zustand und fällt unter Emission von Lichtquanten einer Wellenlänge von 428 nm in den Grundzustand zurück. Durch die Exposition eines Röntgenfilmes können diese Lichtquanten sichtbar gemacht werden. Die Anwesenheit von Phenol im ECL-Kit verstärkt die Chemolumineszenz um den

Faktor 1000 und verlängert die Dauer der Lichtemission auf eine Halbwertszeit von etwa 60 Minuten, das Maximum wird nach 5-20 Minuten erreicht.

Das emittierte Licht wurde durch die Auflage eines Röntgenfilmes in der Dunkelkammer detektiert, wobei in der Regel die besten Ergebnisse bei einer Belichtung für 30 Sekunden erzielt wurden. Anschließend wurde der geschwärzte Film entwickelt.

### 2.3.3 Dialyse

Um Proteine in einen anderen Puffer zu überführen wurde ein Dialyseverfahren verwendet, bei dem die Diffusion kleinerer Moleküle durch die semipermeable Membran eines Dialyseschlauches gut möglich ist, größere Moleküle (verwendete Ausschlussgröße war bei allen Proteinen 12-14 kDa) jedoch nicht passieren können. So kommt es ohne wesentlichen Verlust von Protein sukzessiv zu einem Gleichgewicht der Puffer inner- und außerhalb des Schlauches und, aufgrund des ungleich größeren Volumens außerhalb, zu einem Pufferaustausch im Schlauch.

Die Dialyseschläuche (Spectra/Por MWCO 12-14000, Durchmesser 29mm, Breite 45mm, Spectrum, CA, USA) wurden vor Erstverwendung einige Minuten in destilliertem Wasser ausgekocht und ausgiebig gespült, um Schwermetalle zu entfernen, die diese meist aus regenerierter Cellulose hergestellten Membranen in erheblicher Menge enthalten.

Die Schläuche wurden mit  $H_2O_{\text{dest}}$  auf ihre Unversehrtheit überprüft und an einem Ende mit Dialyseklammern verschlossen. Anschließend wurden die Schläuche möglichst luftfrei und maximal zur Hälfte mit der Probe befüllt, da diese im Rahmen der Dialyse erhebliche an Volumen zunehmen kann. Das kontralaterale Ende wurde ebenfalls mit Dialyseklammern verschlossen. Dialysiert wurde 48 h bei 4°C gegen 5 l 20 mM NaAc-Puffer pH 3. Der Puffer wurde zweimal gewechselt und gerührt, um über einen möglichst großen Konzentrationsgradienten an der Membranoberfläche eine möglichst effektive Entsalzung zu erreichen. Die Schläuche können nach Benutzung gespült, in 70% EtOH verwahrt und nach Spülung mit  $H_2O_{\text{dest}}$  für das gleiche Protein erneut verwendet werden.

### 2.3.4 Ultrafiltration

Mittels Ultrafiltration wurde das Probenvolumen eingeengt, da hier durch Zentrifugation Wasser und kleine Moleküle unterhalb der gewünschten Ausschlussgröße durch eine Membran abpresst, größere Moleküle jedoch zurückgehalten werden. So konnte das Protein auf die gewünschte Konzentration eingeengt werden, ohne die Salzkonzentration signifikant verändert zu haben.

Die Zentrifugationseinheiten (Centriprep, Amicon, Beverly, MA), deren Ausschlussgröße für alle verwendeten Proteine 30 kDa betrug, wurden zunächst mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gespült und anschließend mit max. 15 ml Probe befüllt. Zentrifugiert wurde jeweils eine Stunde bei 4°C und maximal 3000 rpm. Das Filtrat wurde verworfen und der Vorgang so lange wiederholt, bis die Probe die gewünschte Konzentration erreicht hatte. Das Protein wurde auf eine Konzentration von 2mg/ml eingeengt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Zentrifugationseinheiten wurden in 70% EtOH bei 4°C gelagert und wiederverwendet.

### 2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

SDS (sodium dodecyl sulfate) ist eine anionisches Detergenz, das die Eigenladung von Proteinen effektiv überdeckt, so dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen und somit eine ladungsunabhängige Auftrennung von Proteinen ihrer Größe nach möglich ist. Die Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel unter Zugabe eines Auftragspuffers auf 95°C erhitzt. Dieser löst einerseits wegen seines Überschusses an SDS die Sekundär- und Tertiärstrukturen des Proteins indem Wasserstoffbrücken gespalten und so das Molekül gestreckt wird, andererseits vermag er mittels der reduzierenden Thiolverbindung  $\beta$ -Mercaptoethanol Schwefelbrücken zwischen Cysteinen zu spalten.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt in zweiphasigen Gelen, wobei die Proben zunächst im sogenannten Sammelgel auf eine schmale Bande konzentriert und dann im Trenngel entsprechend der Proteingrößen aufgetrennt werden. Da Sauerstoff zum Kettenabbruch führt erfolgte die Polymerisation unter Luftabschluss in vertikalen Gießkammern.

Für vier Trenngele mit 15% SDS-Anteil wurden folgende Mengen verwendet:

H <sub>2</sub> O dest	9,4 ml
1,5M TrisHCl ph 8,8	10 ml
10% SDS	0.4 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid	20 ml
Temed	20 µl
zuletzt 10% Ammoniumpersulfat (frisch)	200 µl

Sofort nach dem Gießen wurde das Trenngel mit Butanol überschichtet um die Oberfläche zu glätten und die Polymerisation durch Reduktion des Sauerstoffkontaktes zu optimieren. Nach ca. 1 h war das Gel fest und das Sammelgel konnte nach Entfernung des Butanols und Einbringen der Auftragskämme gegossen werden:

H <sub>2</sub> O dest	6,625 ml
0,5 M TrisHCl pH 6,8	3,125 ml
10% SDS	250 µl
30% Acrylamid/Bisacrylamid	2,5 ml
Temed	12,5 µl
10% APS	125 µl

Nach dem Festwerden der Gele wurden diese in eine Gelkammer (Biorad) gegeben und diese mit Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben, die zuvor ca. 5 min bei 95°C mit 10x SDS-Auftragspuffer denaturiert worden waren, wurden mittels Hamilton-Spritze in die Kammern eingefüllt. Als Indikator für das Molekulargewicht wurden 10 µl prestained low range marker (Biorad) in eine Vergleichsspur gegeben. Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde zunächst für 5-10 min eine Spannung von 100 V, anschließend für ca. 45 min eine Spannung von 200 V angelegt.

### 2.3.6 Coomassie-Blau-Färbung

Mit dieser Methode können die Proteine direkt im Gel mit dem Farbstoff Coomassie-Blau, einem Triphenylmethanfarbstoff angefärbt werden. Die Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode bei etwa 1 µg Protein. Die Gele werden zunächst für ca. 2h in der Färbelösung belassen, anschließend wird der Hintergrund unter Schütteln in der Entfärbelösung aufgehellt. Wiederholtes Wechseln der Lösung sowie die Zugabe von Kunststoffschwämmen beschleunigt den Entfärbvorgang. Nach kompletter Entfärbung des Hintergrundes wird das Gel photographiert.

### 2.3.7 Quantitative Proteinbestimmung

Der quantitative Nachweis von Proteinen erfolgt meist durch die Reaktion funktioneller Gruppen des Proteins mit farbstoffbildenden Reagenzien, deren Intensität mit der Menge an Protein korreliert und im Photometer erfasst werden kann. Es werden immer mindestens Dreifachbestimmungen gegen einen Leerwert gemessen und gemittelt. Der Leerwert enthält in gleicher Quanti- und Qualität alle Reagenzien der Messreihe, nur wird die Proteinlösung durch destilliertes Wasser ersetzt.

#### *Lowry-Assay*

Hierbei wird die Proteinkonzentration über die Blaufärbung des Reagenz nach Reaktion proteineigener Tyrosin- und Tryptophanreste mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz (Phosphor-Wolfram/Molybdänsäure-Komplex) bestimmt. Der Farbumschlag kann im Photometer erfasst und mit einer entsprechenden Eichkurve, bestehend aus bekannten Konzentrationen des Eichproteins BSA (Bovines Serum Albumin) verglichen werden. Dabei können Proteinkonzentrationen von 1-20 µg erfasst werden. Nachteil der Methode ist eine gewisse Ungenauigkeit, die mit der unterschiedlichen Menge an Tyrosin in verschiedenen Proteinen zu erklären ist. Die BSA-Standardlösung wurde in Triplikaten und Konzentrationen von 0, 25, 50, 75, 150, 200, 250 und 500 µg/ml in 0,5 ml Acetatpuffer in Elisaplatten pipettiert, das gewünschte Protein ebenfalls in Triplikaten zu je 0,5 ml auf möglichst 50-150 µg/ml verdünnt. Nun wurde in jede Vertiefung 0,5 ml Lowry Reagent Solution gegeben, gut gemischt und 20 min bei Raumtemperatur belassen. Unter schnellem Schütteln



wurden dann je 250 µl Folin&Ciocalteu's Phenol Reagent Working Solution zugegeben, die Lösung zum Entwickeln des Farbkomplexes für ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Leser (Shimadzu UV-160A, Duisburg) gemessen. Aus den Werten der Standards wurde die Eichkurve erstellt und daraus die Konzentration des zu bestimmenden Proteins errechnet. Die Reagenzien stammten von Sigma Diagnostics, St.Louis MO, USA.

### *Bradford-Assay*

Diese Methode beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue G250 von 465 nach 595nm, die durch die Bindung des Farbstoffes an das Protein, vornehmlich an Arginin zu erklären ist. Dazu wird 1ml der Bradfordlösung mit einer geeigneten Verdünnung der zu bestimmenden Probe 5 min bei RT inkubiert. Gegen einen Leerwert wird anschließend bei 595 nm die optische Dichte bestimmt. Anhand einer Eichgeraden, für die bekannte Konzentrationen des Eichproteins BSA bei 595 nm vermessen worden waren ist es nun möglich, in dem linearen Bereich zwischen 1-10 µg Protein die Konzentration der Probe zu bestimmen. Für die Messungen und Erstellung der Eichkurve wurde die Lösung "Proteinassay" (Biorad) 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt

### **2.3.8 Sterilisation von Proteinen**

Für die Zugabe der Proteine in Zell-Kulturen wurde steriles Protein benötigt. Dies wurde durch eine Röntgen-Bestrahlung der auf Eis gelagerten Proteinlösung mit 20000 rad erreicht.

### **2.3.9 Enzyme Linked Immuno Sorbant Assays (ELISAs)**

#### *Bestimmung rPnmal spezifischer Antikörper*

Im ELISA wurden die Antikörperantworten der polyklonalen Seren gegen verschiedene Proteine der Ma-Familie getestet. Bei dieser Methode wird das Antigen in einem Adsorbtionspuffer an die Vinyl- Oberfläche einer Mikrotiterplatte (Costar, MA., USA) adsorbiert. Nach Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit

1% BSA werden Seren in seriellen Verdünnungen zugegeben. Die Isotypzusammensetzung der Seren wird dann durch Bindung isotypspezifischer anti-Ratten-Antikörper gemessen. Hierbei wurden Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase (HP)) konjugierte anti-Ratten-Antikörper aus der Maus verwendet. Durch Zugabe von Substraten der HP, wie ortho-Phenyldiamin (OPD) konnte die Bindung des Antikörpers gemessen werden, da OPD durch die HP in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zu einem gelben Farbstoff (2,2-Diaminobenzol) umgesetzt wird. Die Reaktion wird durch Zugabe von HCl gestoppt. Die Menge des gebildeten Farbstoffs wird bei 490 nm im Spektrometer (Dynatech MR4000, Denkendorf) gemessen. Die Menge des gebildeten Farbstoffs ist proportional zur Antikörpermenge.

Alle Schritte haben bei 37°C Inkubationszeiten von 1 h, Antigenbindung und Blockierung können jedoch auch bei 4°C über Nacht erfolgen. Zwischen allen Schritten wurden die Platten gründlich gewaschen (Immunowash, Nunc). Die obere Hälfte der Platte wurde mit 100 µl rPnmal (10 µg/ml in Auftragspuffer) beschichtet, die andere Hälfte wurde zur Detektion der unspezifischen Bindung mit identischer Proteinmenge BSA befüllt. Anschließend wurde, um auch die Ränder zu blockieren ein größeres Volumen (200 µl) Blockierungspuffer verwendet. Nun wurden 100 µl unterschiedlich seriell verdünnte Rattenserum aufgetragen. Für jede Dilution wurden vier Ansätze mit Antigen und vier Ansätze mit dem Kontrollprotein gemessen.

100 µl Anti-Ratten-Antikörper wurden in Verdünnung 1:4000 (IgG + IgM, HP-konjugiert und IgM, unkonjugiert), 1:5000 (IgE, unkonjugiert) oder 1:8000 (IgG1, IgG2a und IgG2b, unkonjugiert) eingesetzt. Der 2. Antikörper wurde 1:4000 verdünnt, wobei wiederum 100 µl pro Loch eingesetzt wurden. Auch das Substrat OPD wird in 100 µl zugegeben. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion nach 4 Minuten wurden 50 µl 3M HCl verwendet. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm im Spektrometer (Dynatech MR4000, Denkendorf) bestimmt und die Hintergrundwerte von den spezifischen Werten abgezogen. Alle Antikörper wurden von Dianova, Hamburg bezogen.

### *Zytokin-ELISA*

Die Zytokin-Konzentrationen in den Zellüberständen wurden für IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-10 mit standardisierten Zytokin-ELISA-Kits der Firma Biosource gemessen. Dazu wurden die Überstände der Restimulationsansätze (2.5.2.), die jeweils 72 h in Gegenwart von rPnmal und zur Negativkontrolle ohne Antigen inkubiert worden waren, auf ELISA-Platten aufgetragen, die bereits mit Antikörpern gegen die Rattenzytokine beschichtet waren. Anschließend wurden HP-konjugierte Antikörper zugegeben, dann mit einem stabilisierten Chromogen (Tetramethylbenzidin) entwickelt. Meist wurden verdünnte Zellüberstände eingesetzt. OD<sub>490</sub>. Ansonsten wurde streng nach Anweisung verfahren. Standards und Proben wurden in Triplikaten gemessen. Aus den Standardwerten wurde eine Standardkurve erstellt, aus der die Konzentrationen in den Zellüberständen errechnet wurden.

### **2.3.10 Analyse des Oberflächenphänotyps mit Hilfe des fluoreszenzaktivierten Zell-Sortierers (FACS)**

Mit Hilfe des FACS können fluoreszenzmarkierte Zellen identifiziert und isoliert werden. Dabei werden im FACScan (Becton Dickinson Immuncytometry Systems) einzelne Zellen von dem Strahl eines Argon-Laser getroffen. Fluoreszenzmarkierte Zellen absorbieren das eingestrahlte Licht und emittieren es bei einer anderen Wellenlänge, die nun detektiert werden kann. Anhand dieser Messung der Fluoreszenz kann eine Aussage über die Farbstoffkonzentration in oder auf der Zelle getroffen werden.

### *FACS-Analyse der T-Zelllinien*

Oberflächenmoleküle sind wichtige Unterscheidungsmerkmale von Zellen, verschiedenen Zellarten sowie einzelnen T-Zell-Subklassen und können mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung detektiert werden. Dabei werden verschiedene Oberflächenmoleküle mit spezifischen, monoklonalen Mausantikörpern identifiziert, deren Bindung anschließend über fluoreszenzmarkierte anti-Maus-Antikörper nachgewiesen werden kann. Dazu wurden ein Farbstoff (DTAF) -markiertes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment gegen Maus-IgG aus der Ziege verwendet. DTAF ist ein relativ stabiles

Derivat des grün leuchtenden Fluoresceins, das bei 495 nm absorbiert und bei 528 nm emittiert. Als Negativkontrolle diente die Hintergrundbindung des isoliert zugegebenen zweiten Antikörpers an die Zellen.

Zur Analyse der T-Zelllinien wurden etwa  $2 \times 10^5$  T-Zellblasten in FACS-Puffer aufgenommen und 3 mal mit FACS-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde für 3 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden je 100  $\mu$ l der folgende Antikörper (Stammlösung 1mg/ml) in den angegebenen Verdünnungen zugegeben:

<b>Antikörper</b>	<b>erkanntes Antigen</b>	<b>Verdünnung</b>
CD3	Pan-T-Zell Marker	1:50
R 73	C-Region des $\alpha/\beta$ -TCR	1:100
CD4	T-Helferzellen	1:100
Ox 8	CD8+ zytotoxische T-Zellen	1:50
mIgG	Maus IgG	1:50
OX 40	CD134 (Marker für T-Zellaktivierung)	1:50
OX 6	MHC Klasse II	1:100
OX 39	IL-2-Rezeptor (Marker für T-Zellaktivierung)	1:50

Außerdem wurde eine Kontrolle ohne Antikörper durchgeführt, um die Hintergrundbindung des 2. Antikörpers zu messen. Es wurde 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer mit jeweils anschließender Zentrifugation wurden die Zellen in 100  $\mu$ l des 2. Antikörpers (1:100 verdünnt in FACS-Puffer) resuspendiert und im Dunkeln für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Zellen in insgesamt 400  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen, dem 5  $\mu$ g/ml Propidiumiodid zugesetzt war. Propidiumiodid lagert sich ausschließlich in tote Zellen ein, die daraus resultierende Rotfärbung wird ebenso detektiert und ermöglicht es, lediglich die vitalen Zellen zu analysieren. Anschließend

wurden die Zellen im FACScan gemessen. Die 1. Antikörper wurden bei Serotec (Wiesbaden, Germany), der 2. Antikörper bei Dianova (Hamburg, Germany) bezogen.

## **2.4 Tierexperimente**

### **2.4.1 Immunisierung der Tiere**

#### *Aktive Immunisierung*

Für die aktive Immunisierung wurden weibliche Inzucht-Ratten im Alter zwischen 6 und 8 Wochen verwendet. Dark Agouti (DA)- und Brown Norway (BN)-Ratten wurden von der Firma Harlan Winkelmann in Borcheln, Lewis-Ratten aus der Zucht des Max-Planck-Instituts für Biochemie bezogen.

Immunisiert wurde mit je 100 µg des rekombinanten Proteins in komplettem oder inkomplettem Freund's Adjuvans (CFA / IFA, Gibco BRL, Karlsruhe, Germany). Das Adjuvans bestehend aus einem Mineralöl dient dazu, das in wässriger Lösung vorhandene Antigen als Depot an der Injektionsstelle mehr oder weniger zu immobilisieren. Über zwei mit einem Konnektor verbundene Tuberculin-Spritzen wurden pro Tier 50 µl Proteinlösung (2 mg/ml) mit 50 µl IFA oder CFA zu einer festen Emulsion verarbeitet und je 100 µl dieses Gemisches den Tieren unter Ethernarkose subkutan in die Schwanzbasis injiziert. Die Tiere wurden 14 Tage später noch einmal mit der gleichen Menge geboostert und ca. 6 Wochen unter täglicher Gewichtskontrolle auf klinische Ausfälle hin beobachtet. Wenn für spätere T-Zell-Linien die Immunreaktion verstärkt werden sollte wurden dem Adjuvans noch 4mg/ml hitzeinaktivierte Mycobacterium tuberculosis (Stamm H 37 RA, Difco Laboratories, Detroit, MI) zugegeben. Dies führt zu einer verstärkten Immunreaktion an der Injektionsstelle und erleichtert die Bedingungen für eine Antigen-spezifische Reaktion. Es wurden jeweils 100 µg Ovalbumin (Ova), hYo, rYo bzw. rPnmal in 100 µl Emulsion injiziert.

### *Adoptiver Transfer spezifischer T-Zellen*

$5 \times 10^6$  -  $2 \times 10^7$  frisch restimulierte T-Zell Blasten in 1 ml EH wurden den wiederum mit Ether narkotisierten Ratten i.v. in die Schwanzvene, alternativ intraperitoneal injiziert.

### **2.4.2 Evaluation des klinischen Status der Tiere**

Die Tiere wurden täglich etwa zur gleichen Tageszeit gewogen und auf allgemeine Krankheitszeichen hin untersucht. Zusätzlich wurde täglich dezidiert die Kraft in der Schwanz- und Extremitäten-Muskulatur geprüft und die Spontanbewegungen der Tiere auf Auffälligkeiten hin beobachtet.

Zur Skalierung wurde folgende für die Evaluierung des Krankheitsgrades bei der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) etablierte Einteilung verwendet:

Grad 0	gesund
Grad 0,5	Parese der Schwanzmuskulatur
Grad 1	Plegie der Schwanzmuskulatur
Grad 2	Parese der Hinterbeine
Grad 3	Plegie der Hinterbeine
Grad 4	Parese der Vorderbeine
Grad 5	Tetraplegie, präfinales Stadium

### **2.4.3 Gewebeentnahme für Zellkultur**

Die Ratten wurden mit Äther betäubt bis keine Atemtätigkeit mehr zu erkennen war, anschließend auf einem Styroporbrett in Rückenlage fixiert und Thorax und Abdomen mit einem Medianschnitt eröffnet. Unter aseptischen Bedingungen wurden nun die gewünschten Organe, wie inguinalen Lymphknoten oder Thymus entnommen und für den raschen Transport zur Sterilbank in EH gelagert. Zur Gewinnung von Serum wurde die Vena cava inferior am Eintritt in den Vorhof durchtrennt. Das ausströmende Blut wurde dem Thorakalraum mit Hilfe von Plastikpasteurpipetten

entnommen und in 15 ml Plastikröhrchen (Greiner) überführt. Nach Koagulation des Blutes bei 4°C wurde das Serum durch Zentrifugation bei 6000 rpm abgetrennt, aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt.

### **2.4.4 Perfusion der Tiere zur histologischen Analyse**

Zur histologischen Analyse des zentralen Nervensystems (ZNS) wurden die Ratten mit 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Dabei wird das Blut des Tieres gegen das Fixans ausgetauscht und das Gewebe durch Quervernetzung der Proteine fixiert. Das Gewebe kann anschließend in Paraffin eingebettet, geschnitten und histologisch untersucht werden.

Nach Organentnahme und Durchtrennung der Vena cava inferior wurden 50 ml Paraformaldehyd langsam und kontinuierlich über den linken Ventrikel in den großen Kreislauf der Ratte injiziert. Eine erfolgreiche Perfusion ist an einer entfärbten Leber und an der völligen Starre des Tieres zu erkennen.

Nach der Perfusion wurde der Ratte Gehirn und Rückenmark entnommen. Die Gewebe wurden zur Nachfixierung über Nacht in Paraformaldehydlösung inkubiert, anschließend in PBS gelagert. Die weitere Aufbereitung der Gewebe wurde am Institut für Hirnforschung der Universität Wien in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Lassmann durch Frau Dr. Romana Hoeflberger durchgeführt.

## **2.5 Zellbiologische Methoden**

### **2.5.1 Kultivierung von Säugerzellen**

Alle Arbeitsschritte wurden unter aseptischen Bedingungen an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Sofern nicht anders vermerkt, fand Zentrifugation bei 4°C und 1200 rpm statt und dauerte 12 Minuten. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.5.2 Etablierung einer Ratten T-Zelllinie

#### *Primärkultur von Ratten T-Zelllinien*

Um T-Zellen isolieren zu können, müssen zunächst Ratten mit dem gewünschten Antigen immunisiert werden, das mit CFA und 4mg/ml abgetöteten *Mycobacterium tuberculosis* (Stamm H 37 RA) emulgiert worden ist. Zehn bis zwölf Tage nach der Immunisierung wurden den Ratten unter aseptischen Bedingungen die regionalen Lymphknoten entnommen, bei der Schwanzbasis als verwendete Immunisierungsstelle folglich die inguinalen.

Nach Entfernung des anhängenden Fett- und Bindegewebes wurden die Lymphknoten in einem Glashomogenisator 3 mal in je 10 ml Eagle's HEPES Medium (EH) vorsichtig homogenisiert. Die Zellen wurden zentrifugiert und zweimal mit je 35 ml EH gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Restimulationsmedium aufgenommen, gut resuspendiert und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe 2.5.4.).  $5 \times 10^7$  Zellen wurden in 5 ml Restimulationsmedium in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm ausgesät. Zur Messung der Zytokine im Überstand wurden einige Schalen mit dem jeweiligen Antigen stimuliert (20 µg/ml), in Kontrollschalen wurden die Zellen ohne Antigen inkubiert, um den Hintergrund zu messen. Außerdem wurden Proliferationstests (siehe 2.5.3.) durchgeführt.

Nach drei Tagen wurden die Zellen abzentrifugiert und jeweils  $2,5 \times 10^8$  Zellen in 10 ml TCGF Medium in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät (Falcon). Der Überstand wurde aliquotiert und für die Zytokin-ELISAs bei -20°C aufbewahrt.

#### *Kultivierung von Ratten T-Zelllinien*

Nach dreitägiger Primärkultur wurden die T-Zellen in IL-2 haltiges Medium (TCGF) überführt, täglich beobachtet, gegebenenfalls mit frischem Medium versorgt und bei Erreichen einer kritischen Dichte geteilt. Nach 7 bis 10 Tagen gehen die Zellen in einen Ruhezustand über und sterben, wenn sie nicht mit einem geeigneten Antigen restimuliert werden.



### *Restimulation von Ratten T-Zelllinien*

Um T-Zellen langfristig in Kultur zu halten, müssen sie bei Eintritt in die Ruhephase mit einem geeigneten Antigen restimuliert werden. Da T-Zellen Antigene nur im Komplex mit körpereigenem MHC erkennen und T-Zell-Aktivierung kostimulatorische Signale erfordert, werden neben dem Antigen auch Antigen-präsentierenden Zellen (APC) benötigt. Diese sind im Thymus in besonders hoher Konzentration vorhanden. Da man die APC für die Präsentation des Antigens benötigt, sie im Gegensatz zu den T-Zellen aber nicht expandieren will wird eine Proliferation der Thymozyten durch Radiatio mit Röntgen-Strahlen verhindert. Dabei ist die Dosis so zu wählen, dass die Teilung zwar inhibiert wird, die Zellen aber noch ihre Aufgabe der Antigenpräsentation erfüllen können. 4000 Rad haben sich dabei als geeignet erwiesen.

Auch die kultivierten T-Zellen wurden abzentrifugiert, in EH aufgenommen und gezählt.  $4 \cdot 5 \cdot 10^6$  Zellen wurden mit  $0.8 \cdot 1 \cdot 10^8$  Thymozyten in 5 ml Restimulationsmedium aufgenommen und in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm ausgesät. Das jeweilige Antigen wurde steril in einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugegeben

### *Isolierung von Thymozyten*

Die Thymi wurden unter sterilen Bedingungen aus naiven, zur Maximierung der Ausbeute an Thymozyten möglichst jungen Ratten präpariert und in EH gegeben. In der Sterilbank wurden sie von anhängendem Gewebe befreit, zerkleinert und dreimal in je 10 ml EH in einem Glashomogenisator vorsichtig suspendiert. Zellfragmente wurden durch Zentrifugation abgetrennt, das Pellet in 35 ml EH gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Thymozyten in etwa 2 ml EH aufgenommen, mit 4000 Rad bestrahlt und gezählt.

### *Dichtegradientenzentrifugation*

Drei Tagen nach der Restimulation wurden die T-Zellblasten von nicht-aktivierten T-Zellen und APCs abgetrennt. Dazu wurden die Zellen aus je zwei Kulturschalen resuspendiert und in einem 15 ml Röhrchen (Greiner) abzentrifugiert. Das Pellet

wurde in 2 ml eiskaltem Lymphoprep (Nycomed, Oslo) resuspendiert, mit 3 ml EH Medium vorsichtig überschichtet und anschließend wurde mit 3000 rpm bei 4°C für 30 min. zentrifugiert. T-Zellblasten haben eine geringere Dichte als T-Zellen und sammeln sich daher während der Zentrifugation an der Interphase zwischen Lymphoprep und EH Medium, dagegen befinden sich die anderen Zellen als Pellet auf dem Boden des Röhrchens. Die Zellen der Interphase wurden mit einer Pasteur Pipette abgesaugt und in TCGF Medium überführt. Durch erneute Zentrifugation wurden Reste von EH und Lymphoprep entfernt, anschließend wurden die Zellen in 10 ml TCGF resuspendiert und in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät.

### 2.5.3 Proliferationstest

Proliferationstests werden durchgeführt, um das Wachstum von T-Zellen nach Restimulation oder in der Primärkultur zu quantifizieren und die Antigenspezifität der T-Zellen zu bestimmen. Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass proliferierende Zellen bei der Replikation ihrer DNA Tritium-markiertes Thymidin einbauen, welches dem Medium zugegeben wird. Ruhende Zellen synthetisieren keine DNA und werden somit nicht radioaktiv markiert.

Proliferationstests wurden parallel zu jeder Restimulation und jeder Primärkultur durchgeführt. Die Zellkulturen wurden 1:4 in Restimulationsmedium verdünnt, also  $1.25 \times 10^6$  Lymphozyten und  $2 \times 10^7$  Thymozyten/ml eingesetzt. Pro Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte wurden 200 µl der Zellsuspension gegeben und mit verschiedenen Antigenen inkubiert, um ihre Proliferation in Abhängigkeit von der Anwesenheit dieser Proteine zu untersuchen. Concanavalin A (Con A), ein unspezifisches Mitogen für T-Zellen diente dabei als Positivkontrolle. Um unspezifische Proliferation zu detektieren wurden als Negativkontrolle andere rekombinante Proteine verwendet, denen mit dem spezifischen Protein nur die Art der Expression und Aufreinigung sowie der His-Tag gemeinsam ist. Als weitere Negativkontrolle diente die Inkubation der Zellen ohne Antigen. Die Antigene wurden mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml (hYo, rYo, rPnma1, hPNMA1, hPNMA2) bzw. 2.5 µg/ml (Con A) zugegeben. Jedes Antigen wurde in Quadruplikaten getestet.

16 Stunden vor Ende der 72 Stunden-Inkubationsdauer wurden schließlich in jede Vertiefung 10  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -markiertes Thymidin in 20  $\mu\text{l}$  EH addiert.

Nach Ablauf der Inkubationsperiode wurden die Zellen mit Hilfe eines Erntegerätes auf einen Glasfaser-Filter übertragen und im Medium lokalisierte, nicht eingebaute Radioaktivität herausgewaschen. Die Filter wurden in einer Mikrowelle getrocknet, anschließend die in die Zellen eingebaute Radioaktivität mit einem Oberflächen- $\beta$ -Strahlen-Messgerät detektiert. Die gemessene Radioaktivität ist direkt proportional zur Teilungsrates der T-Zellen. Aus dem Quotienten der Werte von Proben mit spezifischem Antigen und denen ohne Antigen kann der Stimulationsindex berechnet werden. Für spezifische T-Zelllinien nach Restimulation sollte er größer als 4 sein. Bei Primärkulturen gelten Werte über 2 als signifikant.

### **2.5.4 Lebendzellzahlbestimmung durch Färbung mit Trypanblau**

Eine Anfärbung der Zellen mit Trypanblau ermöglicht die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen, da dieser Farbstoff nur in tote Zellen eindringt und diese tiefblau färbt. Dazu wurde die Zellsuspension abhängig von der erwarteten Zellzahl 1:1 bis 1:5 mit Trypanblau verdünnt und 10  $\mu\text{l}$  dieser Mischung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden die ungefärbten Zellen in den kleinen Quadraten gezählt und daraus die Konzentration vitaler Zellen anhand folgender Formel berechnet:

$$c = \text{Anzahl der Zellen in den kleinen Quadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4/\text{ml}$$

### **2.5.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Um eine intrazelluläre Eisbildung zu verhindern enthält das Einfriermedium Dimethylsulfoxid (DMSO). Aufgrund seiner Zytotoxizität muss die Kontaktzeit mit den Zellen bei Raumtemperatur minimiert werden.

Um die Zellen einzufrieren wurden je  $2 \times 10^7$  Zellen in 1 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und langsam in einer Einfrierbox mit Isopropanol auf  $-80^\circ\text{C}$  heruntergekühlt. Längerfristig wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff

gelagert. Für die Rekultivierung wurden die Zellen aufgetaut, rasch in EH aufgenommen, abzentrifugiert und anschließend in TCGF überführt.

## 2.6 Chemikalienliste

Acetacid	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bis, Rotiphorese 30	Roth, Karlsruhe
Äther	Hoechst, Frankfurt
Agar	Fluka, Seelze
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxidsulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
L-Asparagin	Gibco BRL, Paisley, Schottland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Roth, Karlsruhe
Butanol	Riedl-deHaën, Seelze
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chelating Sepharose Fast Flow	Pharmacia
Concanavalin A	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blau	Sigma, Deisenhofen
Diethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Desoxyribonuklease (DNAse)	Merck, Darmstadt
dNTP	Boehringer, Mannheim
Dulbecco`s Modification of Eagles Medium (DMEM)	Gibco BRL, Paisley, Schottland
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Riedl-deHaën, Seelze

Ethanol	Riedl-deHaën, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Freundsches Adjuvans (komplett)	Gibco Laboratories, NY, USA
Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Riedl-deHaën, Seelze
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, Steinheim
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Riedl-deHaën, Seelze
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid (IPTG)	bts, Leon-ROT
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumbikarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliummonophosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
LDAO (N,N-Dimethyldodalyamin-N-oxid)	Fluka, Seelze
Lowry Protein Assay Kit	Sigma Diagnostics, USA
Lymphoprep <sup>TM</sup>	Nycomed Pharma, Norwegen
Lysozym	Sigma, Steinheim
Methanol	Riedl-deHaën, Seelze
Milchpulver	Frema Reform
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumbikarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

---

Natriumhydrogenkarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Nickelchlorid	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat	Sigma, Deisenhofen
Oligo-dT-Primer	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Orthophenyldiamin (OPD)	Sigma, Deisenhofen
Ovalbumin	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Peptone aus Casein	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Pferdeserum (HS)	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Phenol	Appligene, Heidelberg
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure (37%)	Riedl-deHaën, Seelze
Sodiumlaurylsulfat (SDS)	Roth; Karlsruhe
Superscript RT mit Puffern	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Taq-Polymerase mit Puffern	Boehringer, Mannheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedl-deHaën, Seelze
<sup>3</sup> H-Thymidin	Amersham, Braunschweig

## 2 Material und Methoden

---

Trizol	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Trypanblau	Sigma Cell Culture, USA
Trypton	Sigma, Deisenhofen
Tuberculinspritzen	Poulten&Graf GmbH, Wertheim
Wasserstoffperoxid	Aldrich-Chemie, Steinheim

Plastikwaren wurden von den Firmen Assistant (Sondheim, Falcon (Becton Dickinson, Plymouth/England), Amersham (Braunschweig), Greiner (Flacht) sowie Schleicher & Schüll (Dassel), Filme von der Firma Agfa (München) bezogen.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ovalbumin

#### 3.1.1 Etablierung einer Ovalbumin-spezifischen T-Zelllinie

Parallel zu den Experimenten mit den onkoneuronalen Proteinen wurde eine Negativkontrolle etabliert. Diese wurde mit Ovalbumin, einem Protein aus Hühnereiweiß durchgeführt. Analog zu den Experimenten mit den onkoneuronalen Proteinen wurden die Tiere ebenso mit Ovalbumin in CFA immunisiert, spezifische T-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten der DA-Ratte isoliert und in vitro expandiert. Auch hier zeigten die Proliferationstests gegen verschiedene Proteine die hohe Spezifität der expandierten Linie (Abbildung 2).

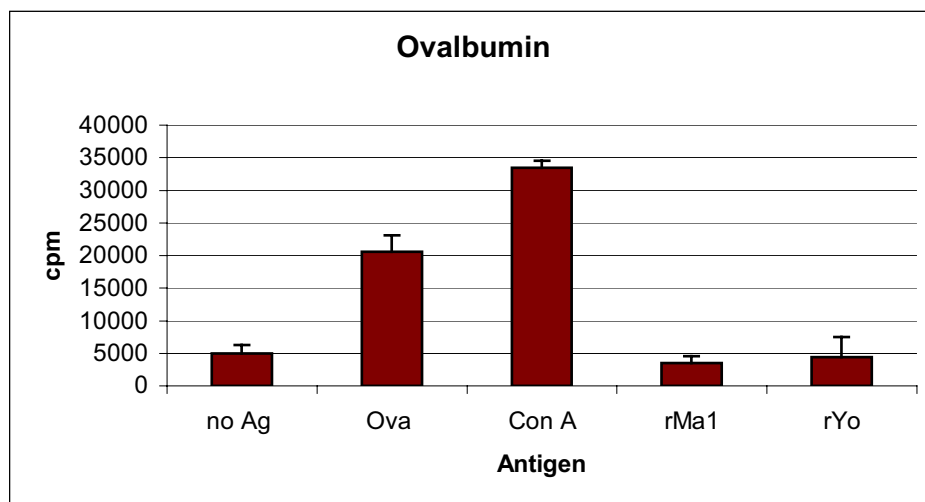


Abbildung 2: Proliferationstest Ovalbumin-spezifischer Zellen

#### 3.1.2 Adoptiver Transfer Ovalbumin-spezifischer T-Zellen

Nach mehreren Restimulationszyklen wurden die gegen Ovalbumin gerichteten spezifischen T-Zellen in naive, 6-8 Wochen alte weiblichen DA-Ratten transferiert.

Die Tiere wurden nach einem Beobachtungszeitraum von insgesamt 6 Tagen perfundiert und das ZNS zur weiteren histologischen Analyse an das Hirnforschungsinstitut in Wien versandt.

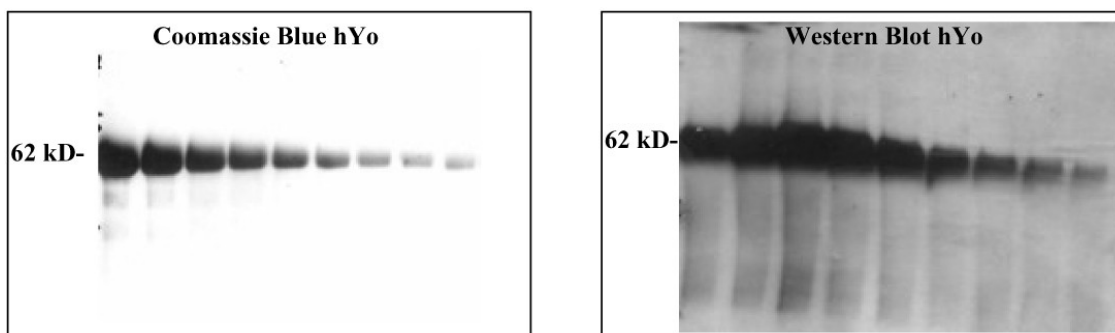
Nach adoptivem Transfer Ovalbumin-spezifischer Zellen zeigten sich histologisch höchstens einzeln eingestreute T-Zellen und nahezu keine Makrophagen in Gehirn und Rückenmark (Abbildung 16).

## 3.2 Humanes Yo

### 3.2.1 Expression und Reinigung des humanen Yo-Proteins

Das Konstrukt für das humane Yo wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Voltz zur Verfügung gestellt. Das erhaltene Plasmid enthält eine Ampicillinresistenz und ist in den *E. coli*-Expressionsstamm DH5 $\alpha$ Fiq kloniert worden, der seinerseits eine Resistenz gegen Kanamycin enthält.

Nach der Aufreinigung des Proteins und Dialyse gegen 20mM Na-Acetatpuffer (pH 3) wurde die Reinheit der Expression auf einem Coomassie-Gel überprüft und zur Kontrolle der korrekten Expression des His-Tag ein Western-Blot mit einem Antikörper gegen diese Struktur angeschlossen (Abbildung 2). Das erhaltene rekombinante Protein wurde durch Messungen mit Lowry und Bradford-Assays auf eine Konzentration von 2 mg/ml eingestellt und so für die weiteren Experimente verwendet.



**Abbildung 2: Protein hYo nach Nickel-Chelat-Chromatographie**

### 3.2.2 Aktive Immunisierung

Immunisierung mit Antigen führt in der Regel über den exogenen Antigen-Prozessierungsweg, unter Beteiligung Antigen-präsentierender Zellen (APC) mit Prozessierung und Präsentation über MHC-II, zu einer Generierung von CD4+ Zellen und Antikörpern. Bei den verschiedenen Immunisierungsprotokollen dienen Adjuvantien dazu, APC zu aktivieren. Diese wiederum können dann effektiver T-Zellen stimulieren, die Zytokinproduktion von NK- sowie anderen Zellen der angeborenen Immunantwort anregen und das Überleben Antigen-spezifischer T-Zellen fördern. Bakterielle Adjuvantien haben dabei die Eigenschaft, zytotoxische T-Zellen besonders gut zu aktivieren. Sie können an verschiedene Rezeptoren binden, die auf DC, Makrophagen, NK und anderen Zellen der angeborenen Immunantwort exprimiert werden, wobei diese Bindung Reifung und Aktivierung dieser Zellen, sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine induziert (Finn et al., 2003).

Beim Menschen ist Autoimmunität relativ häufig mit den HLA Antigenen HLA-B8, HLA-DQ und HLA-DR assoziiert, so dass eine genetische Prädisposition für die Dysregulation der Immunreaktion sicherlich eine Rolle spielt. Aus verschiedenen EAE-Modellen weiß man zudem, dass sich unterschiedliche Tierstämme in ihrem Erkrankungsrisiko sowie der Schwere einer EAE deutlich unterscheiden. Dabei spielen sowohl im Modell als auch bei der humanen Erkrankung, der Multiplen Sklerose genetische, MHC- und nicht MHC-kodierte Regionen eine wesentliche Rolle (Stefflerl et al., 1999; Weissert et al., 1998; Kawakami et al., 2004). So verläuft beispielsweise eine aktiv induzierte EAE in Dark Agouti (DA) -, Brown Norway (BN) - und Lewis (LEW)-Ratten sehr unterschiedlich in Abhängigkeit von dem verwendeten Antigen. Während mit basischem Myelin Protein (myelin basic protein (MBP)) sowohl in der DA- als auch in der Lewis-Ratte eine schwere EAE ausgelöst werden kann (Stepaniak et al., 1995), ist die BN-Ratte gegen eine MBP-EAE resistent (Gasser et al., 1973; Happ et al., 1988). Immunisiert man hingegen mit Myelin Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), so kann sowohl in DA- wie auch in BN-Ratten eine rasch manifeste, schwer verlaufende Erkrankung ausgelöst werden, während die MOG-EAE in der Lewis Ratte spät manifest wird und

wesentlich milder verläuft (Steffler et al., 1999). Inwieweit auch bei der humanen Erkrankung genetische Faktoren eine Rolle spielen ist nicht sicher geklärt. Eine Arbeitsgruppe konnte eine Häufung bestimmter Haplotypen bei kleineren Patientenkollektiven zeigen, andere wiederum konnten diese Beobachtung nicht sicher bestätigen. (Tanaka et al., 1996, Tanaka et al., 1999, Uchuya et al., 1998.).

Um das Risiko zu minimieren, zufällig einen Tierstamm zu wählen, der u. U. für die Induktion einer Yo-vermittelten Entzündung weniger empfänglich ist, wurden für die initialen Experimente, die den klinischen Verlauf nach Proteinimmunisierung untersuchen sollten sowohl DA-, als auch BN- und Lewis-Ratten verwendet. Dabei wurden weiblichen, 6-8 Wochen alte Ratten jeweils 100 µg humanes Yo-Protein in inkompletem Freundem Adjuvans subkutan in die Schwanzbasis injiziert. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes von insgesamt 28 Tage entwickelte keines der Tiere Krankheitszeichen wie Gewichtsverlust, Lähmungen, ataktische Störungen, Koordinationsprobleme oder Verhaltensauffälligkeiten. Im Gegensatz dazu kann bei verschiedenen EAE-Modellen abhängig von verwendetem Antigen und Tierstamm der Krankheitsbeginn zwischen dem neunten und dem vierzehnten Tag nach Immunisierung mit Protein in Freundem Adjuvans beobachtet werden (Abbildung 3).

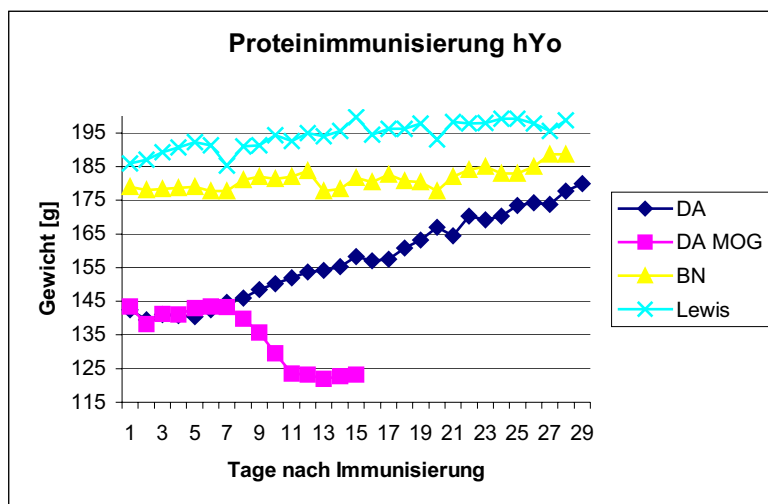


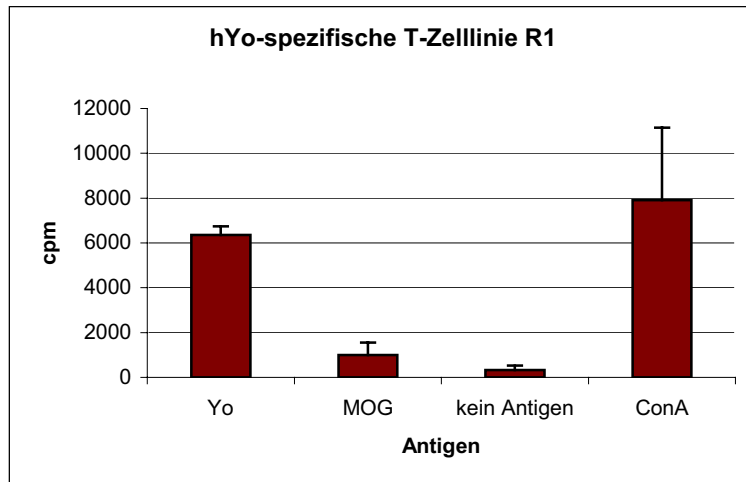
Abbildung 3: Gewichtsverlauf nach Immunisierung mit jeweils 100 µg hYo-Protein:

Alle drei verwendeten Tierstämme nahmen kontinuierlich an Gewicht zu, während die Kontrollgruppe, die mit 100 µg MOG immunisiert wurde mit Beginn des 9. Tages nach Immunisierung deutliche Krankheitszeichen zeigte, die sich unter anderem in einem deutlichen Gewichtsverlust widerspiegeln und so ausgeprägt waren, dass diese Tiere nach wenigen Tagen analog der deutschen Tierschutzbestimmungen eingeschläfert werden mussten.

### **3.2.3 Etablierung einer Yo-spezifischen T-Zelllinie**

Für die weiteren Experimente wurde nur mehr ein Rattenstamm verwendet. Dabei erschienen weibliche DA-Ratten besonders geeignet, da dieser Tierstamm zumindest im Modell der EAE für die Induktion einer Erkrankung besonders empfänglich ist und mit verschiedenen Immunisierungsstrategien eine Erkrankung ausgelöst werden kann.

Für die Etablierung einer Yo-spezifischen T-Zelllinie wurden weiblichen, ca. 6-8 Wochen alte DA-Ratten zehn Tage nach Immunisierung mit 100 µg hYo-Protein in komplettem Freundschem Adjuvans die inguinalen Lymphknoten entnommen und Einzelzellsuspensionen generiert. Diese wurden durch mehrfache Restimulationen in Anwesenheit des Antigens *in vitro* expandiert. Dabei zeigten die T-Zellen bereits nach der ersten Restimulation eine spezifische Reaktion gegen das Zielantigen hYo, während die Hintergrundproliferation gegenüber der Inkubation ohne Antigen und dem Kontrollantigen, dem ebenfalls rekombinant hergestelltem, über seinen Polyhistidin-Schwanz aufgereinigtem MOG-Protein sehr gering war. In Anwesenheit des unspezifischen Mitogens ConA konnte hingegen eine sehr hohe Proliferationsrate detektiert werden (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Proliferationstest der 1. Restimulation der hYo-spezifischen T-Zelllinie**

Es zeigt sich eine hohe Proliferation in Anwesenheit des selektierenden Antigens hYo und des unspezifischen Mitogens ConA, während nur eine sehr geringe Hintergrundproliferation ohne Antigen bzw. in Anwesenheit des Kontrollantigens MOG nachweisbar war.

#### **3.2.4 Adoptiver Transfer hYo-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Drei Tage nach der ersten Restimulation wurden die hYo-spezifischen T-Zellen geerntet und drei naiven weiblichen DA-Ratten jeweils  $2 \times 10^7$  Zellen in die Schwanzvene injiziert. Da bei der EAE beobachtet werden konnte, dass gegen Myelinantigene gerichtete T-Zellen mit jeder Restimulation etwas ihres enzephalitogenen Potentials verlieren, wurde der adoptiven Transfer bereits nach der ersten Restimulation durchgeführt. Aufgrund der lediglich minimalen Kreuzreaktivität gegen das Kontrollantigen MOG und der niedrigen Hintergrundproliferation in Abwesenheit eines Antigens waren zur Erhöhung der Antigen-spezifität ohnehin keine weiteren Restimulationszyklen nötig. Lediglich quantitativ wären weitere Expansionen noch von Interesse gewesen, aber zunächst sollten mit wenigen Tieren vorläufige Daten gewonnen werden, um gegebenenfalls die Versuchsbedingungen modifizieren zu können.

#### *Klinische Symptomatik*

Die Tiere wurden nach dem adoptivem Transfer klinisch beobachtet und täglich gewogen. Keines der Tiere zeigte klinische Auffälligkeiten wie Gewichtsverlust oder

Symptome im Sinne einer Kleinhirnschädigung wie beispielsweise eine Ataxie. Die klassische Transfer-EAE hingegen beginnt klinisch etwa vier Tage nach Applikation der aktivierten T-Zellblasten mit Gewichtsverlust und führt beginnend am Folgetag zu progredienten, häufig letal endenden Paresen (Abbildung 15).

### *Histopathologie*

Die Tiere wurde sechs Tage nach adoptivem Transfer eingeschläfert, das Gewebe durch Perfusion mit 4% Paraformaldehyd fixiert, das ZNS entnommen und zur weiteren histologischen Aufarbeitung an das Institut für Neuropathologie der Universität in Wien versandt. Man weiß aus den Experimenten mit einer durch adoptiven Transfer induzierter EAE, dass zu diesem Zeitpunkt die potentiell pathogenen T-Zellen bereits in das ZNS eingewandert sein sollten (Flügel et al., 2001).

Histologisch zeigten diese Tiere lediglich diskrete meningeale Infiltrate, perivaskulär oder gar parenchymal waren nahezu keine Entzündungszellen nachweisbar. Diese diskrete meningeale Infiltration war ebenso in den mit humanem Yo Protein immunisierten Tieren nachzuweisen, die an Tag 15 nach der aktiven Immunisierung untersucht wurden. Ebenso konnte in diesen Tieren keinerlei perivaskuläre oder parenchymale Entzündungsreaktion detektiert werden, auch hier kam es jedoch zu einer diskreten meningealen Reizerscheinung.

### **3.2.5 Diskussion**

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in vivo oder in vitro aktivierte CD4+ T-Zellen, die spezifisch gegen das humane Yo-Protein gerichtet waren, nicht in der Lage sind, eine klinische Erkrankung in drei verschiedenen Ratten-Stämmen oder histopathologisch detektierbare Veränderungen in DA-Ratten auszulösen. Diese Beobachtung deckt sich mit den bereits publizierten Daten der aktiven Immunisierung mit humanem Yo-Protein, die in Meerschweinchen und Mäusen keinerlei Erkrankungszeichen hervorrufen konnte (Tanaka et al., 1994; Tanaka et al., 1995; Sillevs-Smith et al., 1995).

Auch der adoptive Transfer hYo-spezifischer, in vitro aktivierter und expandierter T-Zellen, die, wenn gegen ein Myelinprotein gerichtet, in der Lage sind in der DA-Ratte eine schwere Enzephalomyelitis hervorzurufen, konnte keinerlei spezifische Krankheitszeichen in der DA-Ratte hervorrufen. Es konnten lediglich äußerst diskrete, vermutlich unspezifische meningeale Infiltrate detektiert werden.

Weshalb der Transfer hYo-spezifischer T-Zellen nicht zu einer Enzephalitis oder neuronalen Degeneration führten ist nicht sicher geklärt.

Möglich erscheinen mehrere Gründe: Zum einen war die Sequenz des Ratten Yo-Proteins nicht bekannt und deshalb auch nicht beurteilbar, ob das fehlende pathogene Potential der spezifisch gegen das humane Yo-Protein gerichteten T-Zellen unter Umständen auf nicht existente oder zu geringe Homologie zurückgeführt werden konnte. Zudem können auch bei einer über das ganze Protein gerechnet sehr hohen Identität der Aminosäuren bereits einzelne Peptidstrukturen eine immunologisch, insbesondere für die T-Zell-Antwort bedeutende Rolle spielen, wenn sich diese auch nur über kurze Peptidstrecken deutlich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Zum zweiten war mit Yo ein lediglich in Purkinje-Zellen exprimiertes Protein gewählt worden, die rein quantitativ einen geringen Teil der Neurone ausmachen. Es wäre durchaus möglich, dass die Präsentation dieses Proteins im ZNS durch Antigen-präsentierenden Zellen bedingt durch dieses Mengenverhältnis nicht stattgefunden hat oder fehlte. Darüber hinaus ist der Mechanismus bei der Entstehung paraneoplastischer Erkrankungen des zentralen Nervensystems nicht sicher geklärt und deshalb ebenso denkbar, dass die CD4-vermittelte Immunantwort in der primären Pathogenese keine wesentliche Rolle spielt oder, isoliert auftretend, nicht bedeutsam ist. So erscheint beispielsweise eine primär CD8-vermittelte Immunreaktion oder eine Kombination aus CD4+, CD8+ sowie Antikörper vermittelter Immunreaktion (Abbildung 19) durchaus denkbar.

Der wichtigste Punkt war zunächst sicherlich, zu klären, inwieweit Sequenzunterschiede zwischen den beiden Spezies nachzuweisen sind, das Ratten Yo zu klonieren und den Versuch mit dem autologen Protein zu wiederholen.



Zudem sollte nun auch ein weiteres mit paraneoplastischen Erkrankungen assoziiertes, jedoch panneuronales exprimiertes Antigen verwendet werden. Dabei fiel die Wahl auf das erst kürzlich beschriebene Protein der Ma-Familie PNMA1 (siehe 1.1.9), da es einerseits durch seine relative Häufigkeit klinisch relevant ist, es der großen Gruppe der immunologisch bedeutsamen Hirn/Hoden-Proteinen zuzuordnen ist und bislang über diese Proteine wenig bekannt ist.

### **3.3 Ratten-Yo**

#### **3.3.1 Klonierung des Ratten-Yo**

Aus dem ZNS weiblicher DA-Ratten wurde mRNA isoliert, transkribiert und als Grundlage für die weiteren Klonierungsschritte verwendet. Basierend auf der Sequenz des humanen Yo-Proteins wurden Primer generiert und mit der Ratten cDNA als Matritze PCR-Reaktionen etabliert. Die erhaltenen Produkte wurden isoliert, gereinigt und von der Firma Toplab, Martinsried sequenziert. Die erhaltenen Fragmente des Ratten Yo-Gens dienten dann wiederum als Matritze für die Entwicklung neuer Primer. Nach mehreren PCR-Schritten, die jeweils zum Erhalt eines bestimmten Fragments der Ratten-Sequenz führten, lag schließlich die gesamte Sequenz des Gens kodierend für das Ratten-Yo vor, mit Ausnahme der Enden, die jeweils durch den anhand der humanen Sequenz etablierten Primer besetzt waren. Diese wurden mit einem Genome walk in der 5'-Region komplettiert. Dieser Ansatz gelang für die 3'-Region leider nicht, da in der Ratte diese Region offensichtlich sehr viele, äußerst lange Introns enthält, von deren Sequenzierung nach mehreren frustrierten Versuchen schließlich Abstand genommen wurde.

Die erhaltene Ratten-Sequenz ist nur zu 85,7 % mit der humanen Sequenz identisch (Abbildung 5), so dass uns die Klonierung des autologen Ratten-Proteins und die Wiederholung der adoptiven Transfer-Experimente mit den gegen autologes Protein gerichteten Zellen gerechtfertigt und sinnvoll erschien.

**rYo: MLADNLVEEF EI -EDEPWYDHRDLHQDLQLAAELGKTL LDRNTELEDSLQQMYTTNQEQL**  
MLA+NLVEEF E+ EDEPWYDH+DL QDLQLAAELGKTL LDRNTELEDS+QQMYTTNQEQL  
**hYo: MLAENLVEEFEMKEDEPWYDHDQLQDLQLAAELGKTL LDRNTELEDSVQQMYTTNQEQL**

**rYo: QEIEYLTKQVELLRQMNEQHAKVYEQLDVTARELEETNQKLVASKASQQKILSLTETIE**  
QEIEYLTKQVELLRQMNEQHAKVYEQLDVTARELEETNQKLV A+SKASQQKILSLTETIE  
**hYo: QEIEYLTKQVELLRQMNEQHAKVYEQLDVTARELEETNQKLVADSKASQQKILSLTETIE**

**rYo: CLQTNIDHLSQVEELKSN-QGRGRQKACDQERPAPSF SCLKELYDLRQH FVYDHFVFAEK**  
CLQTNIDHLSQVEELKS+ QGR CDQE+PAPSF+CLKELYDLRQH FVYDHFVFAEK  
**hYo: CLQTNIDHLSQVEELKSSGQRRSPGKCDQEK PAPSFA CLKELYDLRQH FVYDHFVFAEK**

**rYo: ITSLQSQSPDEEENEHLKKA VTM LQAQLSLERK KRVSV EAEYK VVLKENSELEQQLSAT**  
ITSLQ Q SPDEEENEHLK K VTM LQAQLSLER+KRV++E EY +VLKENSELEQQ L AT  
**hYo: ITSLQSQSPDEEENEHLKKT VTM LQAQLSLERQ KRV TMEEEYGLVLKENSELEQQ LGAT**

**rYo: DAYRARAQELEAEVAEMRQMLQAEHPFVNGVEKLV PDSL FVPFKEPSQS LLEEMFLAAPE**  
AYRARA ELEAEVAEMRQMLQ+EH PFVNGVEKLV PDSL+V PFKEPSQS LLEEMFL PE  
**hYo: GAYRARALEAEVAEMRQMLQSEHPFVNGVEKLV PDSL YV PFKEPSQS LLEEMFL TVPE**

**rYo: AHRKPLKRSSSETV LSSLAGD DIVKDHEDTCIRRAKAVKQRGISLLHEVDTQYSALKVKY**  
+HRKPLKRSSSET+LSSLAG DIVK HE+TCIRRAKAVKQRGISLLHEVDTQYSALKVKY  
**hYo: SHRKPLKRSSSETILSSLAGSDIVKGHEETCIRRAKAVKQRGISLLHEVDTQYSALKVKY**

**rYo: EELLRKQEQDSL SHKAVQTSRLLTRDLTGLVPQSEAGASGWEPTPVSPEPISSPTT**  
EELL+KCQ+EQDSL SHKA + ++ QSE ASGWE V PEP SSP TT  
**hYo: EELLKCKQEQDSL SHKAGRPPG-CSQGPDWSDAQSEPVASGWELASVNPEPVSSP-TT**

**rYo: PPEYKALFKEIFSCIKKTKQEIDEQRTKYPSLSSYS**  
PPEYKALFKEIFSCIKKTKQEIDEQRTKY SLSS+S  
**hYo: PPEYKALFKEIFSCIKKTKQEIDEQRTKYRSLSSHS**

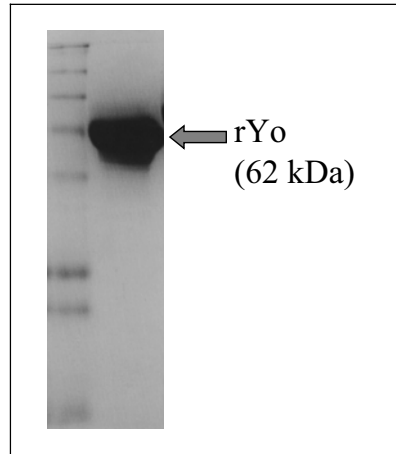
#### **Abbildung 5: Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen Ratten Yo und der publizierten humanen Yo- Sequenz.**

Von den 455 Aminosäuren der beiden Proteine waren 390 identisch, was einem Prozentsatz von 85,7% entspricht, wobei die unterschiedlichen Aminosäuren in einem längeren Bereich der 3`-Region kumulieren.

#### **3.3.2 Expression und Reinigung des Ratten Yo Proteins**

Ratten Yo wurde mit Hilfe der beiden Restriktionsenzyme NcoI und BglII in den Expressionsvektor pQE60 kloniert und die Sequenz durch Isolation des Plasmids und nachfolgende Sequenzierung bestätigt. Rekombinantes Protein wurde wie beschrieben über Einschlusskörperchen und anschließende Nickel-Chelat-Chromatographie gereinigt. Die Reinheit des Proteins wurde in der Coomassie-Färbung evaluiert

(Abbildung 6) und das Protein durch Western Blot mit anti-His-Antikörper identifiziert.



#### **Abbildung 6: Rekombinant exprimiertes rYo**

Nach Überexpression in Einschlusskörperchen und anschließender Nickel-Chelat-Chromatographie wurde die Reinheit des erhaltenen Proteins rYo in der Coomassie-Blau Färbung bestätigt.

#### **3.3.3 Aktive Immunisierung**

##### *Krankheitsverlauf*

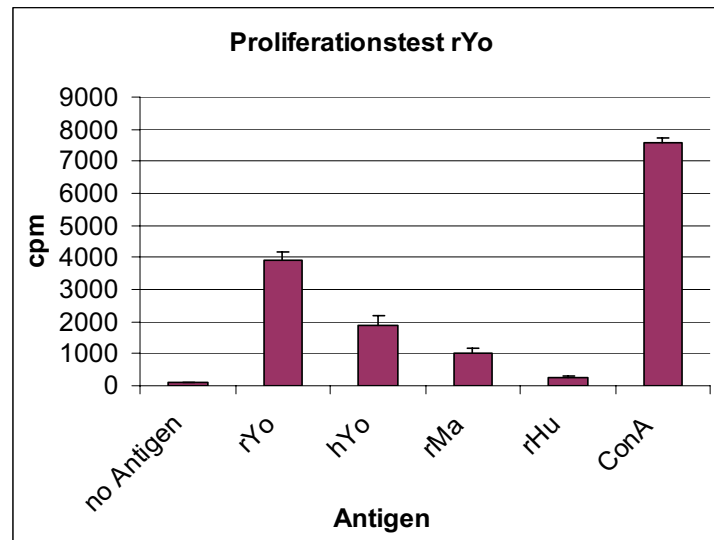
Weibliche DA-Ratten im Alter von 6-8 Wochen wurden mit jeweils 100µg Protein in IFA immunisiert. Bis 21 Tage nach der Immunisierung zeigte keines der Tiere Krankheitszeichen im Sinne einer zerebellären Symptomatik oder Gewichtsverlust. Ein Teil der Tiere wurde 15 Tage nach Immunisierung perfundiert und im Institut für Neuropathologie an der Universität in Wien analysiert.

Histologisch konnten nach Proteinimmunisierung leichte meningeale Infiltrate im Bereich des Kleinhirns nachgewiesen werden, darüber hinaus konnten einige wenige perivaskulär lokalisierten Makrophagen, jedoch keine T-Zellen detektiert werden.

#### **3.3.4 Etablierung einer rYo-spezifischen T-Zelllinie**

Weibliche DA-Ratten wurden mit 100µg rYo in komplettem Freundschem Adjuvans immunisiert und aus den drainierenden Lymphknoten Einzelzellsuspensionen

generiert. Diese wurden in Anwesenheit des rYo Antigens inkubiert und durch wiederholte Restimulationen mit Antigen und Antigen-präsentierender Zellen expandiert. Die Spezifität der Proliferation wurde durch Inkubation mit verschiedenen Kontrollantigenen detektiert (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Proliferationstest Ratten Yo**

In Anwesenheit des zur Etablierung der Zellen verwendeten Antigen rYo konnte eine sehr hohe Proliferation detektiert werden, die gegenüber des zu 85% homologen Antigens hYo bereits deutlich reduziert war. In Anwesenheit der Kontrollantigene rMa und rHu konnte kaum mehr eine über die Hintergrundproliferation hinausgehende Zellteilung nachgewiesen werden. Die Inkubation mit dem unspezifischen Mitogen ConA diente als Positivkontrolle.

#### 3.3.5 Adoptiver Transfer rYo spezifischer Zellen

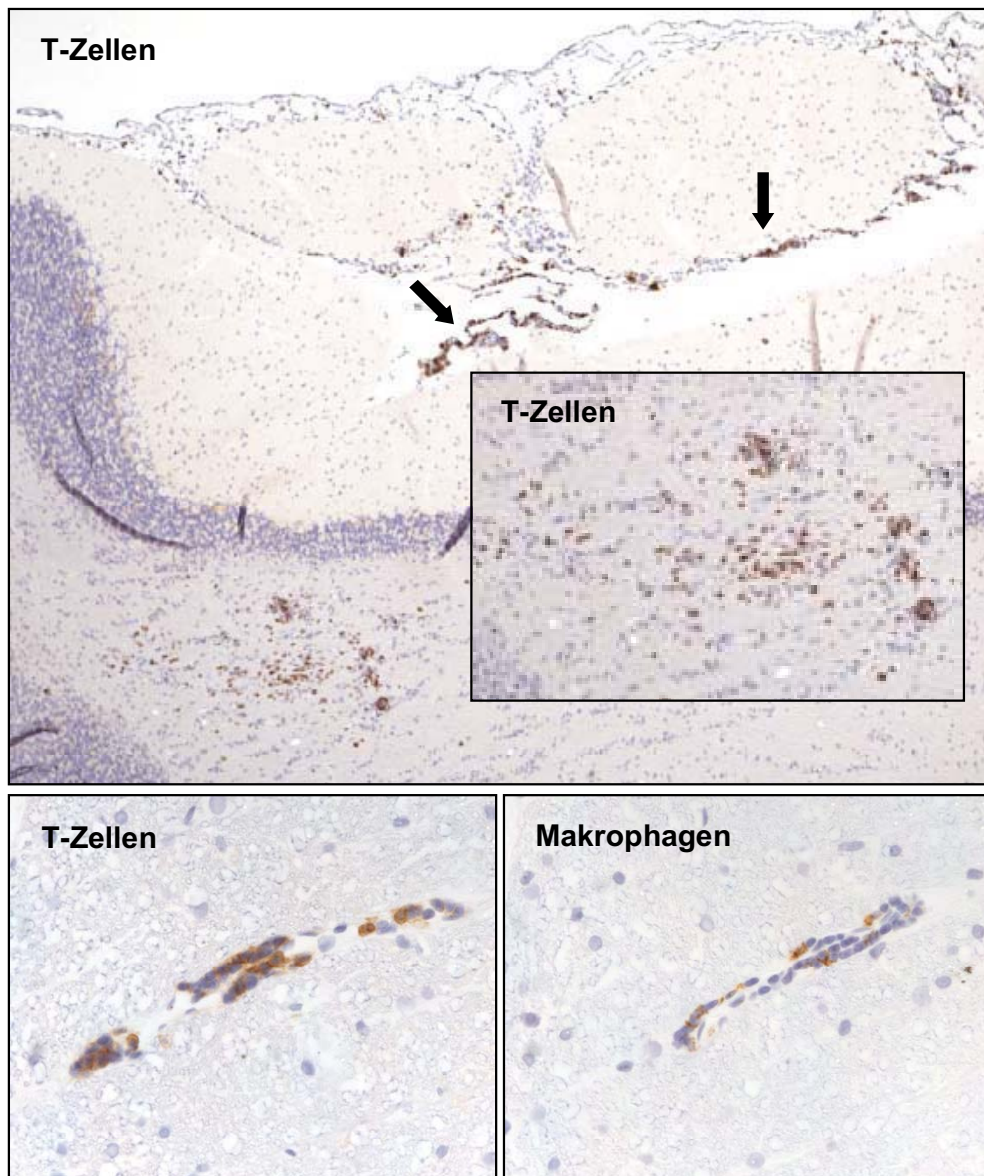
##### *Krankheitsverlauf*

Jeweils  $2 \times 10^7$  rYo-spezifische T-Zellblasten wurden drei Tage nach der zweiten Restimulation in naïve weibliche DA-Ratten im Alter von 6-8 Wochen transferiert. Die Tiere zeigten auch am sechsten Tag nach T-Zelltransfer keine Krankheitszeichen wie Gewichtsverlust oder zerebelläre Symptome und wurden für die weitere

histopathologische Analyse am Institut für Neuropathologie an der Universität in Wien perfundierte.

*Histopathologischer Befund*

In den Ratten, die mit spezifisch gegen rYo gerichteten T-Zellen immunisiert worden waren konnte im Gegensatz zu den mit hYo-spezifischen Zellen transferierten Tieren deutliche histopathologische Veränderungen detektiert werden. Dabei kam es sowohl zu meningealen, aber auch perivaskulären und vereinzelt sogar parenchymalen Infiltraten. Diese waren insbesondere im Kleinhirn, in geringerer Intensität auch im Hirnstamm, vereinzelt auch telenzephal nachweisbar. Mesenzephalon, Myelon und Dienzephalon, die die Hauptlokalisation der mittels Transfer rPnma1-spezifischer T-Zellen transferierten Enzephalomyelitis darstellten, waren kaum betroffen (Abbildung 8). Im Gegensatz dazu kam es nach Transfer Ova-spezifischer T-Zellen nicht zu entzündlichen Veränderung des ZNS, so dass es sich wohl um einer Antigen-spezifische T-Zell-Reaktion handelt.



**Abbildung 8: Cerebellum nach Transfer rYo-spezifischer T-Zellen**

Es zeigten sich insbesondere im Bereich des Kleinhirnes lokalisierte meningeale (Pfeile), perivaskuläre und parenchymale Infiltrate von T-Zellen und Makrophagen.

## 3.4 Ratten Pnma1

### 3.4.1 Klonierung von Ratten-Pnma1

Da für die zelluläre Reaktivität schon einzelne Aminosäuresequenzen bei der Epitoperkennung entscheidend sein können wurde erneut das autologe Protein verwendet.

Da für das PNMA1 lediglich die humane Sequenz publiziert war, wurde zunächst das korrespondierende Antigen der Ratte kloniert (rPnma1). Da für die späteren Versuche Dark-Agouti (DA) -Ratten verwendet werden sollten wurde für die Klonierungsarbeit auch aus diesen Tieren gewonnene cDNA verwendet.

Anhand der humanen Nukleotidsequenz wurden spezifische Primer entwickelt und mit deren Hilfe rPnma kloniert und sequenziert.

Anhand der Sequenziererergebnisse war nun ein Großteil der gesuchten Sequenz bekannt, jedoch fehlten sowohl am 3'- wie auch am 5'-Ende der nun vorhandenen Sequenz die Nukleotide, die durch die humanen Primer repräsentiert wurden, sowie weitere jeweils weiter 5'- bzw. 3'-gelegene Nukleotide. Obgleich die Sequenzen der Ratten- und der humanen cDNA so homolog sein musste, dass die humanen Primer jeweils in der Lage waren an die Strukturen der Ratten-Sequenz zu binden, so war doch eine exaktere Analyse dieser Region entscheidend. Es sollten ja nicht nur Ratten-fremde Aminosäuresequenzen vermieden werden, es war auch nicht klar, ob das Ratten Pnma1 auch wirklich die gleiche Länge wie das humane Korrelat aufweisen würde oder ob das Start- respektive das Stopkodon weiter in Richtung 3' bzw. 5' verschoben sein würde.

Für die Analyse der verbleibenden Strukturen wurde ein Ratten „genome walker kit“ verwendet. Sein Prinzip beruht auf dem Vorhandensein der gesamten genomischen Ratten DNA in restringierter Form in fünf verschiedenen Datenbanken, genannt „libraries“, an die nun sowohl die mitgelieferten vorgefertigten Primer (AP1), sowie die anhand der gewünschten Ratten Sequenz synthetisierten Primer (Ma1 gw ii dist, Ma1 gw 3' i1) binden konnten. Um die Reaktion spezifischer zu gestalten wurde an die erste PCR-Reaktion auf das erhaltene Produkt eine sogenannte „nested PCR“

angeschlossen. Dazu wurde ein zweiter, zur Produktmitte hin verschobener Primer, in der Nähe des ersten Primers synthetisiert (Ma1 gw ii prox, Ma1 gw 3' i2) und mit dem mitgelieferten Primer (AP2) eine erneute PCR unter gleichen Bedingungen mit dem ersten PCR-Produkt als Matritze durchgeführt und das Produkt sequenziert.

Die Analyse der erhaltenen Sequenz zeigte für das Start- respektive das Stopkodon die gleiche Lokalisation, wie es anhand der humanen Sequenz vermutet werden konnte. Ratten Pnma1 hat also in etwa die gleiche Größe wie das humane PNMA1. Die erhaltene Sequenz wurde durch mehrmalige Sequenzierreaktionen bestätigt und in der Pubmed unter der GeneBank Accession Nummer AF\_335505 und NM\_130820 für rPnma1 publiziert (Abbildung 9).

```
5' atggcgatgacactgttgaagactggtgccgggggatggatgtaactcccagagagctctgttagctggggcatcca
gtgaactgtgatgaggctgaaatcgaagagacctccaggctcgcgatccccaggctcctaccgaatgctgggagaatgtct
ggaggaagaaaatcgaaagcagccttattagagctcactggcgtgtagattacgccgcatcccaggagatgccggg
caaaggaggggtctgaaagtgtatttaagcccccaactctgatgctgaattttagaagattgcacctctctagctagagag
gggtggaccgtgcaagatgtgccgtgtccttgggttcagaacctactccgacccggggcccagagatgccagcagagatg
ctaaactatatttgataatgtattcagcctctgttgagtccatattgtacaagaggtgacactttctcggggaggacatccc
agggcctggagaggaaacctttgatccctggctggagcacactaatgaggtcctagaggagtggcagggtgccgatgtagaaa
agaggcggcgggtgatggagagcttagaggcccccgctgatgtattcgcacctaagccaacaaccccgcgataacca
ctgccgaatgcctgaaggccttgagcaggtgttgggagcgttgagagctctagggatcccagatcaaatctgaacttat
cagaacccgggagaaaaattgtctgcttatgtcattcgtctggagcctctgtacagaaggtgtagagaagggggccattgata
aagataatgtgaaccaggcccgctagagcaggtcattgccggggccaaccacagcggggccatccgaaggcagctgtggct
taccggggtggggaaggccagccccaaacctcttcagttgctggtgcagatccgtgaggaggaagccaaggaggagga
ggaggaggctgaggccaccctctgcagttaggcctggaaggcactctga 3'
```

#### **Abbildung 9: Coding region rPnma1**

Anhand der Nukleotidsequenzen wurde das erhaltene Ratten-Pnma1 in die Aminosäuresequenz translatiert (Pubmed ORffinder) und mit der humanen Sequenz des hPNMA1 und hPNMA2 (Pubmed BLAST) verglichen (Abbildung 10).



Das komplette rPnma1-Protein besteht aus 353 Aminosäuren und besitzt zu dem humanen orthologen Protein eine Identität von insgesamt 93,8%. Die 22 Aminosäuren, in denen sich die beiden Proteine unterscheiden erscheinen randomisiert über das Protein verteilt. Im Gegensatz dazu sind Ratten Pnma1 und das humane PNMA2 lediglich zu 47% identisch. Die Unterschiede sammeln sich hier insbesondere in der Glutamat-reichen C-terminalen Region des Proteins.

Es fanden sich keine offensichtlichen Motive in der erhaltenen Sequenz. Eine 51% Identität gegenüber dem humanen MOAP-1 (modulator of apoptosis) legt den Verdacht nahe dass es sich bei dem Protein PNMA1 evtl. eine Funktion in der Regelung von Apoptose zukommen könnte (Tan et al., 2001).

Jedoch wurde relativ neu auch ein weiteres Protein der Ma-Familie beschrieben, das PNMA3. Dieses enthält zudem ein Zink-Finger-Motiv, das sehr häufig in Transkriptionsfaktoren gefunden wird sowie einen Polypyrimidin-Trakt, der wiederum ein geläufiger Bestandteil ribosomaler Proteine ist. Diese Beobachtung lassen hingegen eher vermuten, dass die Ma-Proteine eine Rolle in der mRNA-Biogenese spielen könnten (Rosenfeld et al., 2001).

PNMA1	<u>MAMTLLLEDWCRGMDVNSQRALLVWGIPVNCDEAEIEETLQAAMPQVS-YRVLGRMFWREE</u>	59
<b>Pnma1</b>	<b><u>MAMTLLLEDWCRGMDVNSQRALLVWGIPVNCDETEIEETLQAAMPQVS-YRVLGRMFWREE</u></b>	<b>59</b>
PNMA2	<u>MALALLEDWCRIMSVDEQKSLMVTGIPADFEAEIQEVLQETLKSLGRYRLLGKIFRKQE</u>	60
PNMA1	<u>NAKAALLELTGAVDYAAIPREMPGKGGVWVKVLFKPPTSDAEFLEFLERLHLFLAREGWTVDV</u>	119
<b>Pnma1</b>	<b><u>NAKAALLELTGTVDYSLIPREMPGKGLWVVKPPTSDAEFLEFLERLHLFLAREGWTVDV</u></b>	<b>119</b>
PNMA2	<u>NANAVLLELLEDTDVSAIPSEVQGGVWVKVIFKTPNQDTEFLERLNLFLKEGQTVSGM</u>	120
PNMA1	<u>ARVLGFQNPTPTPG----PEMPAEMLNYYILDNVIQPLVESIWKRLTLFSGRDIPGPGEE</u>	175
<b>Pnma1</b>	<b><u>ARVLGFQNPAPAPG----PEMPAEMLNYYILDNVIQPLVESIWKRLTLFSGRDIPGPGEE</u></b>	<b>175</b>
PNMA2	<u>FRALGQEGVSPATVPCISPELLAHLGQAMAHAPQPLLP-MRYRKLRFVSGSAVPAPPEE</u>	179
PNMA1	<u>TFDPWLEHTNEVLEEWQVSDVEKRRRLMESLRGPAADVIRILKSNPAITTAECKALEQ</u>	235
<b>Pnma1</b>	<b><u>TFDSWLEHSNEVIEEWQVSDIEKRRRLMESLRGPAADVIRILKTNPAITTAECKALEQ</u></b>	<b>235</b>
PNMA2	<u>SFEVWLEQATEIVKEWVPTAEAKKRWLAESLRGPALDLMHIVQADNPSISVEECKLEAFKQ</u>	239
PNMA1	<u>VFGSVESSRDAQIKFLNTYQNPGEKLSAYVIRLEPLLQKVVEKGAIDKDNVNQARLEQVI</u>	295
<b>Pnma1</b>	<b><u>VFGSVESSRDAQVRFNLTQNPGEKLSAYVIRLEPLLQKVVDKGAIDKDNVNQARLEQVI</u></b>	<b>295</b>
PNMA2	<u>VFGSLESRRTAQVRYLKYQEEGKVSAYVLRLETLLRRAVEKRAIPRIADQVRLEQVM</u>	299
PNMA1	<u>AGANHSGAIRRQLWLTGAGEGAPAPNLFQLLVQIREEEAKE-----EEEEAEATLLQL</u>	347
<b>Pnma1</b>	<b><u>AGANHSGALRRQLWLTGATEGAPAPNLFQLLVQIREEEAKE-----EEEEAEALLQL</u></b>	<b>347</b>
PNMA2	<u>AGATLNQMLWCRLELKD-QGPPPSFLFLMKVIREEEEEASFENESIEEPEERDGYGRW</u>	358
PNMA1	<u>GLEGHF</u>	353
<b>Pnma1</b>	<b><u>GLEGHF</u></b>	<b>353</b>
PNMA2	<u>NHEGDD</u>	364

#### **Abbildung 10: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Ratten Pnma1, humanem PNMA1 und humanem PNMA2**

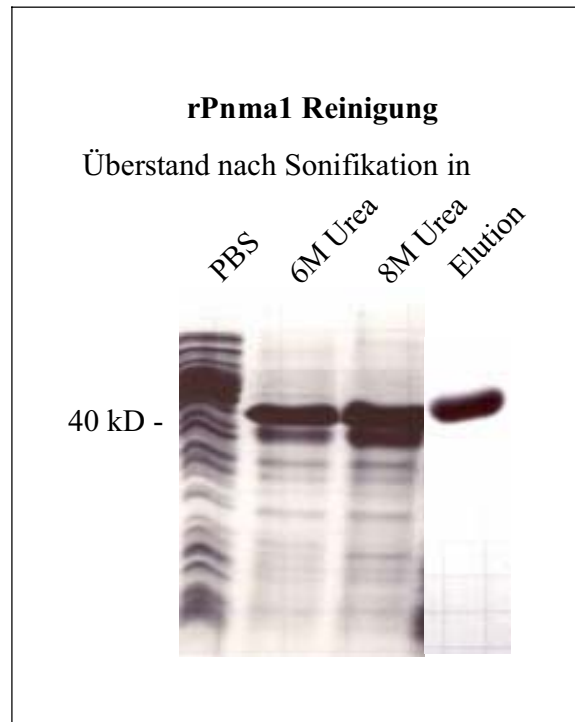
Ratten Pnma1 (Gene Bank AF\_335505 und NM\_130820) ist mit dem humanen PNMA1 (AAN\_05100) auf Aminosäureebene zu 93.8% identisch, verglichen mit dem humanen PNMA2 (NP\_009188) liegt die Identität des Ratten Pnma1 lediglich bei 47.0%. Die identischen Aminosäuren sind unterstrichen.

Für die Klonierung der rPnma1-Sequenz in einen Expressionsvektor wurde zunächst mit neuen Primern (Ma1 5' und Ma1 3'), die die gesamte Ratten-Pnma1-Sequenz umfassten unter Verwendung von Ratten cDNA als Template Ratten-Pnma1 sequenziert und als Vorlage für die weitere Klonierungen benutzt. An das erhaltene Produkt wurde mittels weiterer PCR-Reaktionen unter jeweils geringfügiger Erweiterung des 5'-Primers in die 5'-Richtung und des 3'-Primers in 3'-Richtung weitere Nukleotide angehängt. Diese waren für die Klonierung in den gewünschten Vektor pQE60 nötig und enthielten die für das ausgewählte Restriktionsenzym geeignete Schnittstellen. Bei der Wahl des Restriktionsenzym war darauf zu achten, daß die in den Vektor klonierte Sequenz, hier Ratten-Pnma1 keine Nukleotidfolge enthielt, die durch das Restriktionsenzym ebenfalls geschnitten werden würde.

#### **3.4.2 Expression und Reinigung des rPnma1**

Nach Reinigung des Proteins über eine Nickel-Säule wurde das erhaltene Protein auf einem SDS-PAGE mit Coomassie-Blue Färbung dargestellt und ein Western Blot angeschlossen (Abbildung 11).

Für spätere Experimente wurde das Protein über eine Expression in Einschlusskörperchen aufgereinigt, was eine deutlich höhere Reinheit von Pnma1 zu Folge hatte.



**Abbildung 11: Rekombinant exprimiertes rPnma1**

In der Coomassie-Färbung sind die Überstände nach den verschiedenen Beschallung aufgetragen. In PBS geht rPnma1 nicht in Lösung, wohl aber in 6M und 8M Harnstoffpuffer. Nach Elution des an die Nickelsäule gebundenen Proteins zeigt sich die Reinheit des rPnma1.

### 3.4.3 Aktive Immunisierung

#### *Klinische Symptomatik*

Für dieses Experiment wurden zunächst weibliche DA-Ratten im Alter von etwa 6-8 Wochen verwendet, da diese für die Induktion der vom Krankheitsmechanismus ähnlichen experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), wie zum Beispiel die MOG-induzierte EAE besonders empfänglich ist. Auch haben weibliche Tiere in Analogie zu der humanen Geschlechterverteilung bei Autoimmunerkrankungen in aller Regel ein höheres Risiko, dass eine experimentelle Enzephalitis tatsächlich ausgelöst werden kann. Nach aktiver Immunisierung der DA-Ratten mit 100 µg rPnma1 in CFA zeigten die Tiere über einen Beobachtungszeitraum von insgesamt 15

Tagen keinen wesentlichen Gewichtsverlust oder klinisch-neurologische Auffälligkeiten.

#### *Histopathologischer Befund*

Fünfzehn Tage nach Immunisierung zeigte sich histopathologisch in allen sechs Tieren geringe Infiltrate im Sinne kleiner perivaskulärer Cuffs, die sich mit dem Makrophagenmarker ED1 positiv anfärbten. In zwei von sechs Tieren konnten auch eine diskrete T-Zell-Infiltrate detektiert werden. Der Inflammationsindex, der aus der Anzahl der angefärbten T-Zellen respektive Makrophagen in 20 aufeinanderfolgenden Schnitten bestimmt wurde betrug 0.08.

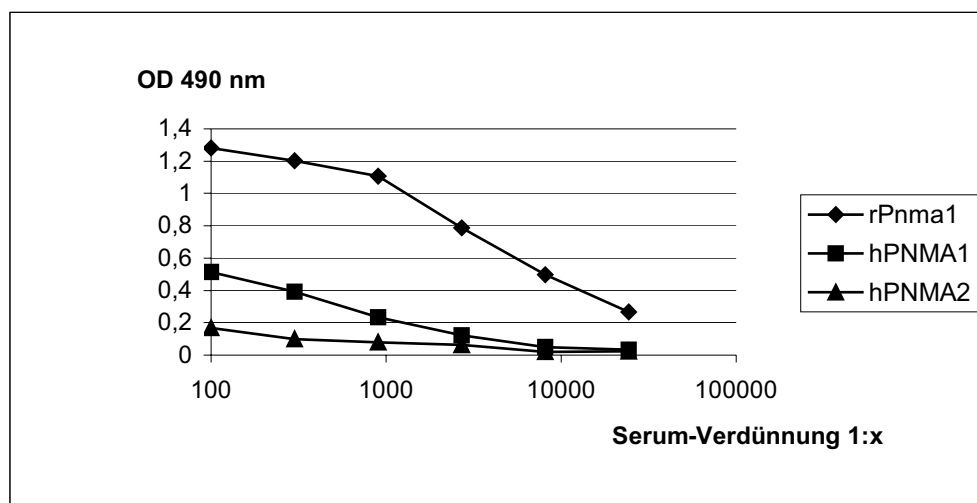
Im Gegensatz zu diesen Daten konnte weder durch Immunisierung mit dem humanen Yo-Protein (siehe 3.2.) noch mit Ovalbumin (siehe 3.1.) eine Meningoenzephalitis induziert werden. Dies spricht für eine Antigen-spezifische, gegen das neuronale Protein gerichtete Entzündung, weniger für eine unspezifische Infiltration.

#### *Antikörper*

Das Serum, das den Ratten ebenfalls 15 Tage nach der aktiven Immunisierung entnommen worden war wurde auf ihre Antikörper-Reaktivität hin untersucht. Dabei konnte sowohl im ELISA als auch im Western Blot ein hoher Antikörper-Titer gegen rPnma1 nachgewiesen werden. Diese Antikörper zeigten interessanterweise nur eine geringe Kreuzreaktivität gegen das humane Protein PNMA1, obwohl, wie bereits gezeigt, die Homologie auf Aminosäureebene zwischen diesen Proteinen mit 93,8% sehr hoch ist. Hier wird erneut deutlich, wie entscheidend sich bereits kleine Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf die immunologische Antwort auswirken können und impliziert die Verwendung autologer Proteine für die Durchführung aussagekräftiger Experimente. Auf Antikörperebene war gegen das zu 47% homologe humane PNMA2 war fast keine Kreuzreaktivität nachweisbar (Abbildung 12). Dies zeigt die große Spezifität der Immunreaktion gegen das rPnma1 und spricht dagegen, dass die Antikörper ausschließlich gegen Strukturen gerichtet sind, die den Proteinen

aufgrund der identischen Expression gemeinsam sind, wie zum Beispiel der Bereich des Polyhistidin-Schwanzes oder Kontaminationen, die aus der bakteriellen Expression und Aufreinigung resultieren. Eben diese Spezifität zeigt erneut die Wichtigkeit der Verwendung autologer Proteine für immunologische Experimente.

Obwohl diese Ergebnisse für eine hochspezifische Antikörperantwort sprechen konnte allein durch die Antikörperantwort keine wesentliche Erkrankung in den Tieren ausgelöst werden.



**Abbildung 12: Antikörperreaktivität nach aktiver Immunisierung mit rPnma1**

Die Seren der mit dem rPnma1 Protein immunisierten Ratten wurden im ELISA auf Antikörperreaktivitäten getestet. Das Serum zeigt eine sehr deutliche Reaktivität gegen das zur Immunisierung verwendete rPnma1 Protein, eine weit schwächere Reaktion gegen das sehr homologe humane Protein PNMA1. Gegen das humane PNMA2 war kaum eine Kreuzreaktion nachweisbar.

#### 3.4.4 Etablierung und Charakterisierung rPnma1 spezifischer T-Zellen in vitro

Nach Immunisierung mit rPnma1 in vollständigem Freundschem Adjuvans (CFA) wird das Protein von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen, prozessiert und zu lymphatischen Geweben transportiert, insbesondere zu den regionalen drainierenden Lymphknoten. Dort präsentieren aktivierte dendritische T-

Zellen das intrazellulär prozessierte Antigen in Form kurzer Peptide über MHC-Moleküle an ihrer Oberfläche.

Bei der durchgeführten aktiven Immunisierung in die Schwanzbasis kam es folglich zu einer ausgeprägten Proliferation spezifischer Lymphozyten in den inguinalen Lymphknoten. Aus Suspensionen dieser Lymphknoten wurden zehn Tage nach Immunisierung T-Zellkulturen generiert und durch wiederholte Restimulationen mit dem spezifischen Antigen rPnma1 in Il-2 haltigem Medium in vitro expandiert. Ihre Spezifität konnte in verschiedenen Proliferationsassays gezeigt werden. Hierbei wurde durch Inkubation mit verschiedenen Antigenen eine konstante Anzahl von T-Zellen für jeweils drei Tage kultiviert und die Proliferationsrate mit Hilfe von <sup>3</sup>H-markiertem Thymidin quantifiziert. 16 Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit zugegeben, wird dieses bei der Replikation der Zellen in die DNA eingebaut und kann dann über Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität in Zerfällen pro Minute zur Bestimmung des Stimulationsindex herangezogen werden. Dieser ergibt sich aus dem Quotienten der Proliferation in An- bzw. Abwesenheit des selektierenden Antigens. Als Kontrollantigene wurden wiederum die humanen Ma- Proteine PNMA1 und PNMA2 verwendet, sowie als Positivkontrolle das potente, unspezifische Mitogen für T-Zellen Concanavalin A. Unspezifische Hintergrundproliferation wurde durch Inkubation ohne Antigen detektiert.

#### *Proliferationstest*

Der Stimulationsindex zeigte für alle untersuchten T-Zell-Ansätze sowohl für den Primäransatz als auch für alle durchgeführten Restimulationen eine hochspezifische Proliferation der Zellen in Anwesenheit des Antigens rPnma1. Wie durch die hohe Homologie zu dem humanen PNMA1 Protein erwartet, war die Proliferationsrate in Anwesenheit des humanen PNMA1 nur leicht reduziert. Mit dem humanen Protein PNMA2 war eine Kreuzreaktion kaum mehr detektierbar (Abbildung 13A).

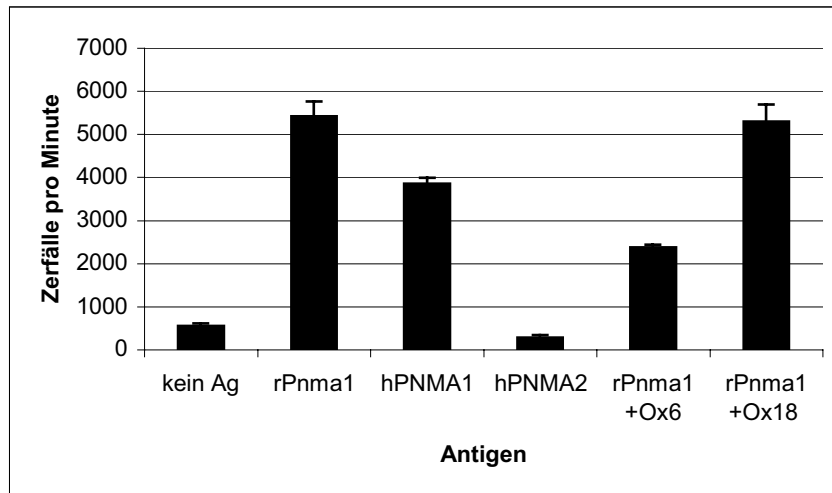
Zum zweiten wurde die Proliferation der spezifischen Zellen gegen rPnma1 unter der Anwesenheit von Antikörpern gegen MHC-I respektive MHC-II untersucht. Hier zeigte sich, dass die Zugabe des gegen MHC-II gerichteten Antikörpers Ox 6 die

Proliferation der T-Zellen deutlich reduzierte, ein Effekt, der unter Anwesenheit des gegen MHC-I gerichteten Antikörpers Ox 16 nicht beobachtet werden konnte. Die MHC-II restringierte Antigenerkennung dieser T-Zellen spricht sehr für das prädominante Vorliegen von CD4<sup>+</sup> Zellen in der Kultur, ein Ergebnis, was aus analogen Vorversuchen mit Myelin-spezifischen Antigenen sowie aus dem Immunisierungsmechanismus zu erwarten gewesen war und später in der FACS-Untersuchung bestätigt werden konnte (siehe 3.4.4.).

#### *Zytokin-ELISA*

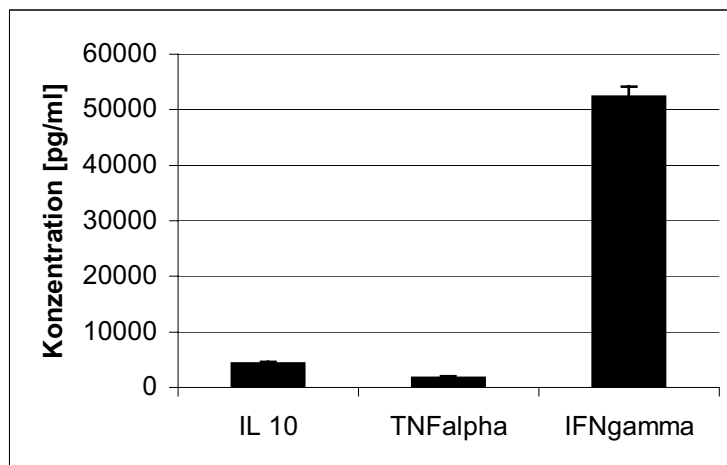
Die Überstände der proliferierenden Zellen wurden zudem mittels Zytokin-ELISA auf ihre Zytokinproduktion hin untersucht. Dabei konnte insbesondere eine hohe Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden, während hingegen das prädominant anti-inflammatorische Th2-Zytokin Il-10 nur in geringem Ausmaß detektiert werden konnte. Diese Daten ermöglichen eine Zuordnung der CD4<sup>+</sup> Zellen zum T<sub>H</sub>1- Subpopulation (Abbildung 13 B).

Durch mehrfache Restimulationen mit rPnma1, denen unspezifische Proliferationsphasen in IL-2-haltigem Medium folgten, konnten rPnma1 spezifische Zelllinien aus Lymphknoten generiert werden, die über mehrere Restimulationszyklen hinweg stabil kultiviert werden konnten.



**Abbildung 13A: Charakterisierung der rPnma1 spezifischen T-Zell Antwort: Proliferationstest**

Die Antigenspezifität sowie die MHC-Restriktion wurden durch den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin quantifiziert. Die T-Zellen reagieren hochspezifisch gegen das rPnma1 Protein und haben eine hohe Kreuzreaktivität gegen das humane PNMA1, nicht jedoch gegen das humane PNMA2. Die Proliferation wird durch Zugabe eines Antikörpers gegen MHC Klasse II (Ox6), nicht jedoch durch einen Antikörper gegen MHC Klasse I (Ox18) gehemmt.



**Abbildung 13B: Charakterisierung der rPnma1 spezifischen T-Zell Antwort: Zytokin-Sekretionsprofil**

Das Zytokin-Sekretionsprofil der rPnma1-spezifischen T-Zellen wurde durch eine Analyse der Zellüberstände mittels Zytokin-ELISA erstellt. Die im Vergleich zu der geringen Konzentration an IL-10 sehr hohen IFN- $\gamma$  Sekretion ermöglicht eine Zuordnung der T-Zellen zum Th1-Untertyp.



#### *Oberflächentypisierung*

Die in vitro expandierten, gegen Pnma1 gerichteten T-Zellen wurden zudem mittels FACS-Analyse weiter charakterisiert. Dabei wurden bestimmte Oberflächenmoleküle mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper nachgewiesen und die T-Zellen somit phänotypisiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese T-Zelllinien hauptsächlich zur  $CD3^+ CD4^+ TCR\alpha\beta^+$  Subklasse zugehörig waren (Abbildung 14).

Die Zellen waren fast ausschließlich CD4-positiv (92%) und trugen  $\alpha/\beta$  T-Zell-Rezeptoren (82%). Bei 92% der Zellen konnte der IL-2-Rezeptor, bei 96% CD134 als Zeichen ihrer Aktivierung nachgewiesen werden. M1 zeigt die gesetzte Grenze an, nach der der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen berechnet wurde.

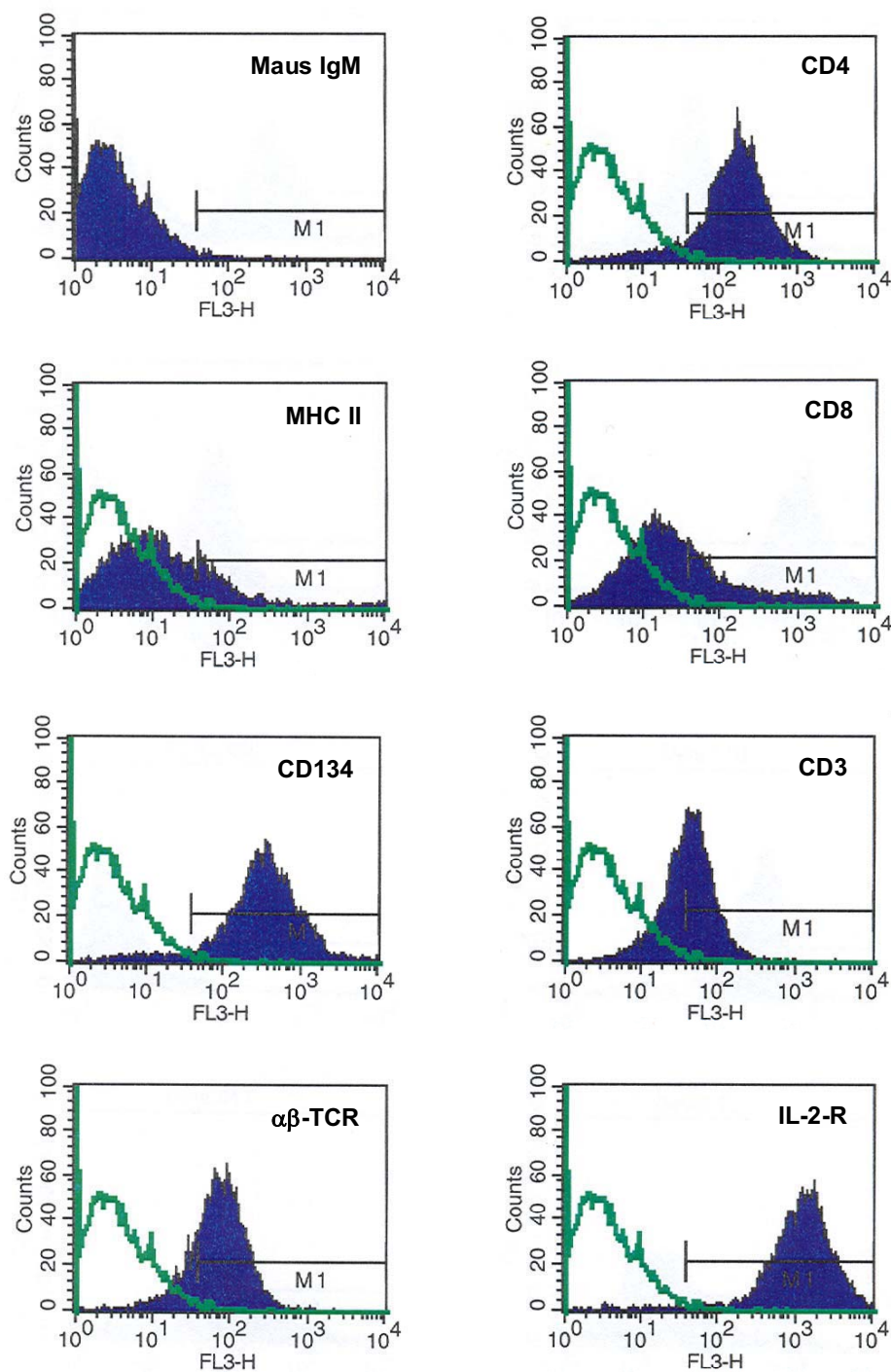


Abbildung 14: FACS-Analyse der Zelllinie.

### **3.4.5 rPnma1-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren eine Autoimmunenzephalitis**

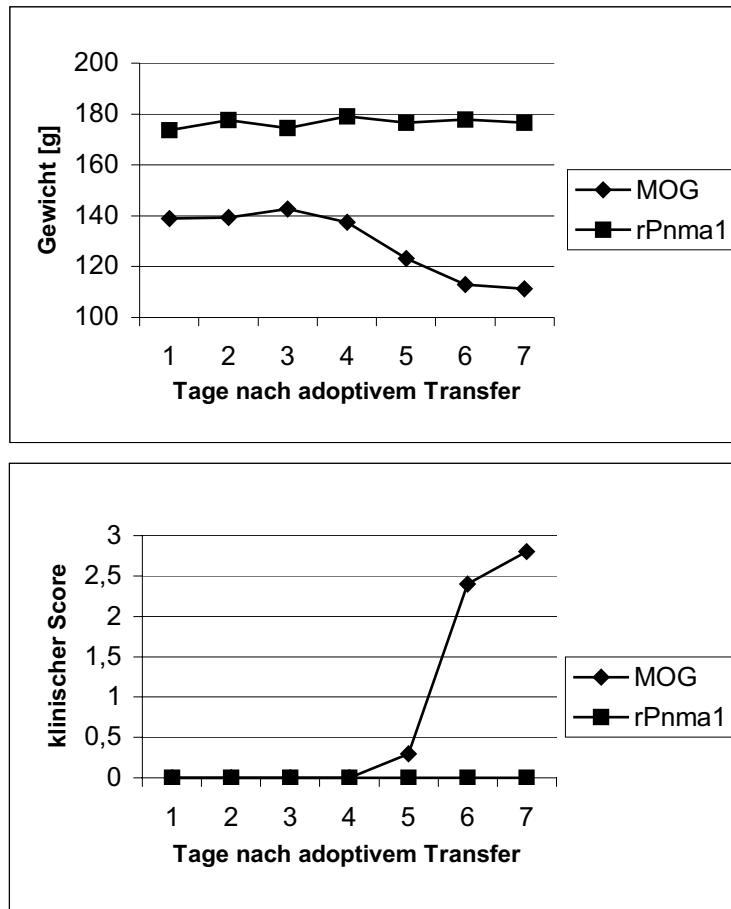
Aus den in vitro kultivierten rPnma1-spezifischen T-Zellen wurden drei Tage nach der Restimulation über einen Dichtegradienten die proliferierenden und deshalb größeren Blasten geerntet und jeweils  $5 \times 10^6$  bzw.  $2 \times 10^7$  T-Zellblasten in naive weibliche und männliche DA-Ratten transferiert. Die Applikation der Zellen erfolgte nach Möglichkeit intravenös in die Schwanzvene, alternativ nach mehrfachen frustrierten Punktionsversuchen gelegentlich auch intraperitoneal.

#### *Klinische Symptomatik*

Auch diese Tiere blieben während des gesamten Beobachtungszeitraumes bis maximal zehn Tage nach passivem Transfer der Zellen klinisch neurologisch unauffällig und verloren nicht an Gewicht.

Im Vergleich dazu manifestiert sich eine EAE nach adoptivem Transfer MOG-spezifischer T-Zell-Blasten (MOG-spezifische Zellen wurden freundlicherweise von Fr. Dr. Anna Schubart zur Verfügung gestellt) bereits zwischen dem dritten und vierten Tag, wobei bereits der Transfer von  $5 \times 10^6$  aktivierten MOG-spezifischen T-Zellen in DA-Ratten zu einer akuten, innerhalb von 7 Tagen letal endenden Erkrankung führt (Abbildung 15).

Die Tiere wurden an den Tagen vier, sechs und neun nach T-Zelltransfer mit 4% PFA-Lösung perfundiert und das ZNS für histopathologische Untersuchungen entnommen. Wiederum wurden diese von Dr. Romana Höftberger an der Universität in Wien durchgeführt.



**Abbildung 15: Gewichtsverlauf und klinischer Score von DA-Ratten nach Transfer rPnma1- bzw. MOG-spezifischer T-Zellen**

Im Gegensatz zu den Tieren, denen über einen adoptiven Transfer MOG-spezifische T-Zellen injiziert wurden und die beginnend mit Tag 4 nach Transfer deutliche klinische Krankheitszeichen mit Gewichtsverlust und Paresen zeigten blieben die mit rPnma1-spezifischen CD4+ Zellen transferierten Tiere klinisch unauffällig und nahmen an Gewicht zu.

*Histopathologischer Befund*

Trotz fehlender klinischer Symptomatik entwickelten diese Tiere histopathologisch signifikante entzündliche Veränderungen im ZNS. Die Infiltrate waren insbesondere perivaskulär und meningeal lokalisiert und setzten sich aus T-Zellen wie auch aus aktivierten Makrophagen und Mikroglia zusammen. Ein Teil der T-Zellen konnte auch im Parenchym detektiert werden. Bei den parenchymatös lokalisierte T-Zellen

konnte zudem teilweise ein Apoptoseprozess nachgewiesen werden, der durch nukleäre Fragmentation und Kondensation der T-Zellen charakterisiert war. Das Infiltrationsmaximum konnte an Tag 6 nach passivem Transfer der rPnma1-spezifischen T-Zellen detektiert werden. Die Antigenspezifität der entzündlichen Infiltrate wurde durch den adoptiven Transfer  $2 \times 10^7$  Ovalbumin-spezifischer T-Zellen bestätigt, der in insgesamt sechs weiblichen DA-Ratten nicht zu entzündlichen ZNS-Veränderungen führte ( $p=0.001$ ).

Diese durch spezifisch gegen rPnma1 gerichtete T-Zellen induzierten entzündlichen Infiltrate innerhalb des ZNS waren sehr ähnlich zu denen, die nach dem Transfer spezifisch gegen den Myelin-Bestandteil S100 gerichteter T-Zellen zu finden waren (Berger et al., 1997). Ebenso waren sie auch assoziiert mit der Expression von MHC Klasse II sowohl auf Makrophagen und aktivierten Mikroglia wie auch auf Lymphozyten. Zwar konnten MHC Klasse I/  $\beta 2$ -Mikroglobulin-Komplexe auf den erwähnten Zellen nachgewiesen werden, für die Expression von MHC Klasse I auf Oligodendrozyten, Astrozyten oder Neuronen fanden sich jedoch keine Hinweise. Zeichen einer Demyelinisierung konnten ebenso nicht detektiert werden. Sowohl nach Proteinimmunisierung wie auch nach adoptivem Transfer konnte eine diffuse zytoplasmatische Färbung der Neurone für IgG und Komplement nachgewiesen werden, die wohl als unspezifische Entzündungsreaktion mit konsekutivem Untergang einzelner Neurone zu werten ist.

Im Gegensatz zu der klassischen EAE, bei der insbesondere das Rückenmark von Entzündung und Demyelinisierung betroffen ist, konnte in diesem Modell nach Transfer rPnma1-spezifischer T-Zellen vor allem eine Beteiligung weiterer ZNS-Strukturen nachgewiesen werden. So waren die entzündlichen Läsionen hier insbesondere im Bereich des Mesenzephalon, der Medulla oblongata, des Dienzephalon und des Telenzephalon inklusive Nucleus caudatus und Putamen lokalisiert. Interessanterweise sind auch bei Patienten, die unter einem anti-Ma assoziiertem paraneoplastischen Syndrom leiden, sowohl klinisch als auch histopathologisch insbesondere Mesenzephalon und Dienzephalon betroffen (Dalmau et al., 1999; Voltz et al., 1999; Rosenfeld et al., 2001).

Die Lokalisation der entzündlichen Infiltrate der Pnma1-transferierten Tiere steht zudem im Gegensatz zu den rYo-immunisierten Tieren, bei denen die pathologischen Veränderungen insbesondere im Kleinhirn, in geringerem Ausmaß auch im Hirnstamm detektiert werden konnten. Dies deckt sich mit der Lokalisation von Entzündung und neuronalem Untergang, die entsprechend bei Patienten mit einem anti-Yo assoziierten paraneoplastischen Syndrom ebenso in zerebelläre Strukturen und Hirnstamm gesehen werden. Somit entspricht die in den Tieren abhängig von dem Zielantigen detektierbare Entzündung in ihrem Verteilungsmuster in etwa der bei mit anti-Ma bzw. anti-Yo Reaktivität assoziierten paraneoplastischen Erkrankung.

Tier	d.p.i.	Zahl transferierter T-Zellen	I.I. W3/13 (T-Zellen)	I.I. ED1 (Makrophagen)
1	d 4	$2 \times 10^7$	0	0
2	d 4	$2 \times 10^7$	0	0,03
3	d 6	$2 \times 10^7$	0,21	0,42
4	d 6	$2 \times 10^7$	0,11	0,33
5	d 9	$5 \times 10^6$	0,03	0,15
6	d 9	$5 \times 10^6$	0	0,07
7	d 9	$5 \times 10^6$	0,03	0,03
8	d 9	$5 \times 10^6$	0	0
9	d 9	$2 \times 10^7$	0,07	0,04
10	d 9	$2 \times 10^7$	0,14	0,33
11	d 9	$2 \times 10^7$	0,1	0,13
12	d 9	$2 \times 10^7$	0,08	0,08
13	d 9	$2 \times 10^7$	0	0,08

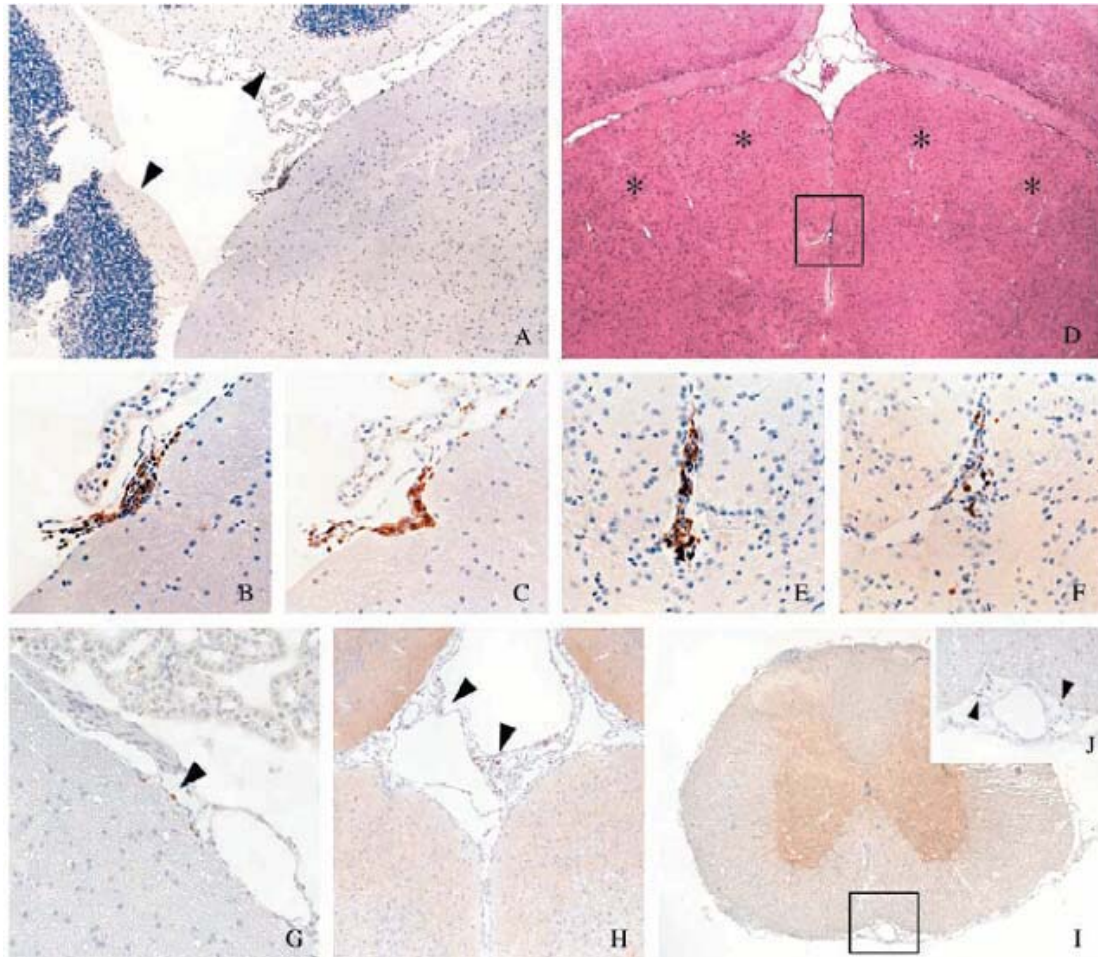
**Tabelle 2: Inflammations-Index (I.I.) für T-Zellen und Makrophagen / aktivierte Mikroglia weiblicher DA-Ratten nach Transfer rPnma1 spezifischer T-Zellen.**

Hingegen zeigten die 6 DA-Ratten sechs Tage nach dem Transfer  $2 \times 10^7$  OVA-spezifischer CD4+ T-Zellen einen Inflammationsindex (W3/13) von 0.0 ( $p=0.001$ ) verglichen mit den rPnma1-transferierten Tieren 3-13, (Mann-Whitney test).

d.p.i.                   Tage nach T-Zell Transfer

I.I.                       Inflammationsindex

W3/13            Färbung für T-Zellen  
 ED1             Färbung für Makrophagen/aktivierte Mikroglia



#### Abbildung 16: Histologie nach Transfer rPnma1-spezifischer T-Zellen

Entzündliche Infiltrate nach dem adoptiven Transfer Pnma1 spezifischer T-Zellen: In der Medulla oblongata zeigten sich ED1 positive, die Meningen infiltrierende Makrophagen (A: cerebellum 100x, B: 400x), sowie w3/13 positive T-Zellen (C: 400x). Ein ähnliches Bild zeigte sich im Mesenzephalon (D: HE 40x, Sterne markieren die Colliculi anterior) mit meningealen Infiltraten aus ED1 positiven Makrophagen (E: 400x) und w3/13 positiven T-Zellen (F: 400x), die beginnend in den perivaskulären Raum invadieren. Hingegen zeigten die Tiere nach adoptivem Transfer Ovalbumin-spezifischer Zellen höchstens einzeln eingestreute T-Zellen und nahezu keine Makrophagen in Gehirn (G: ED1, 200x, Medulla oblongata; H: w3/13, 100x, Mesenzephalon) und Rückenmark (I: w3/13 40x; J: w3/13 400x).

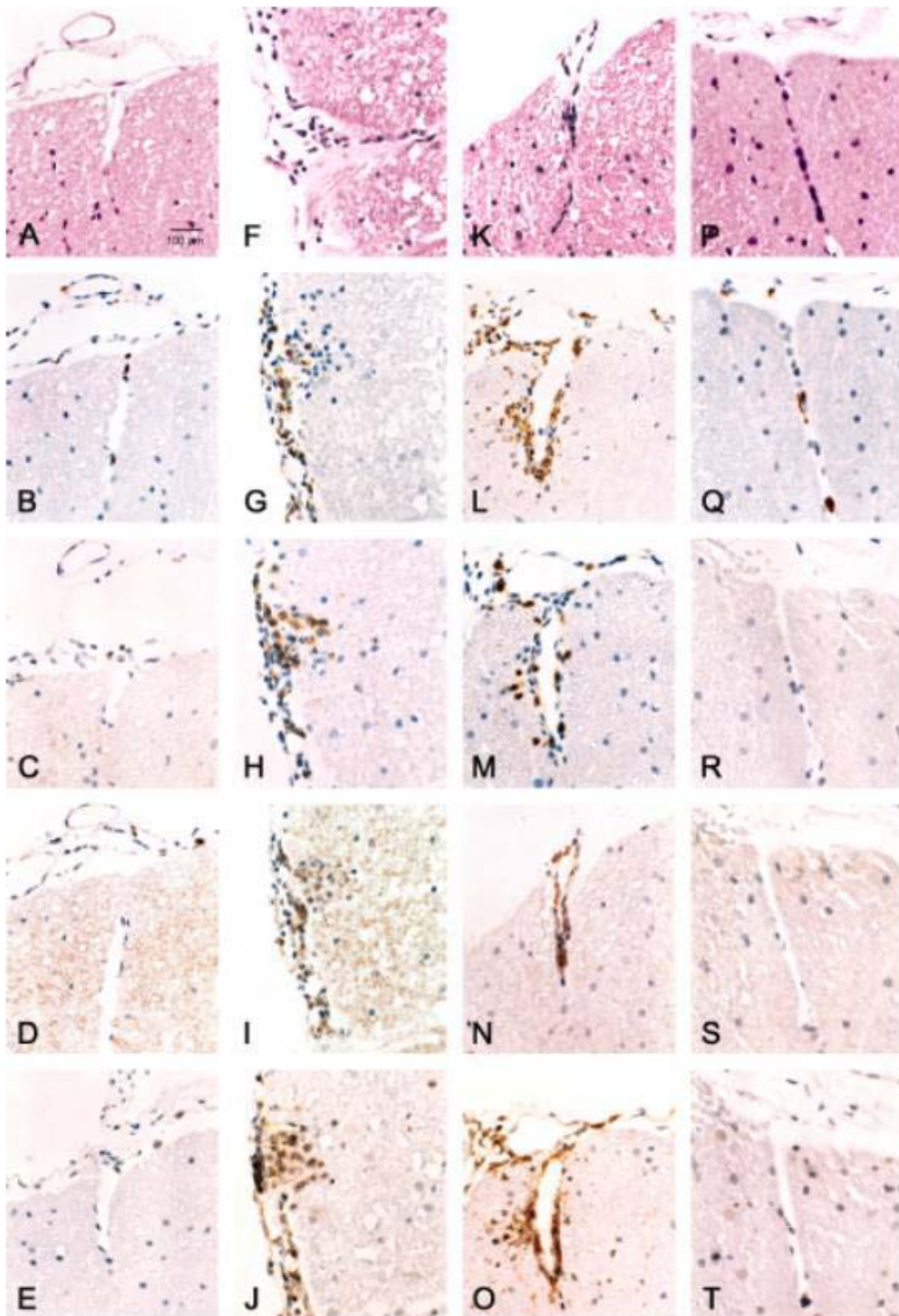
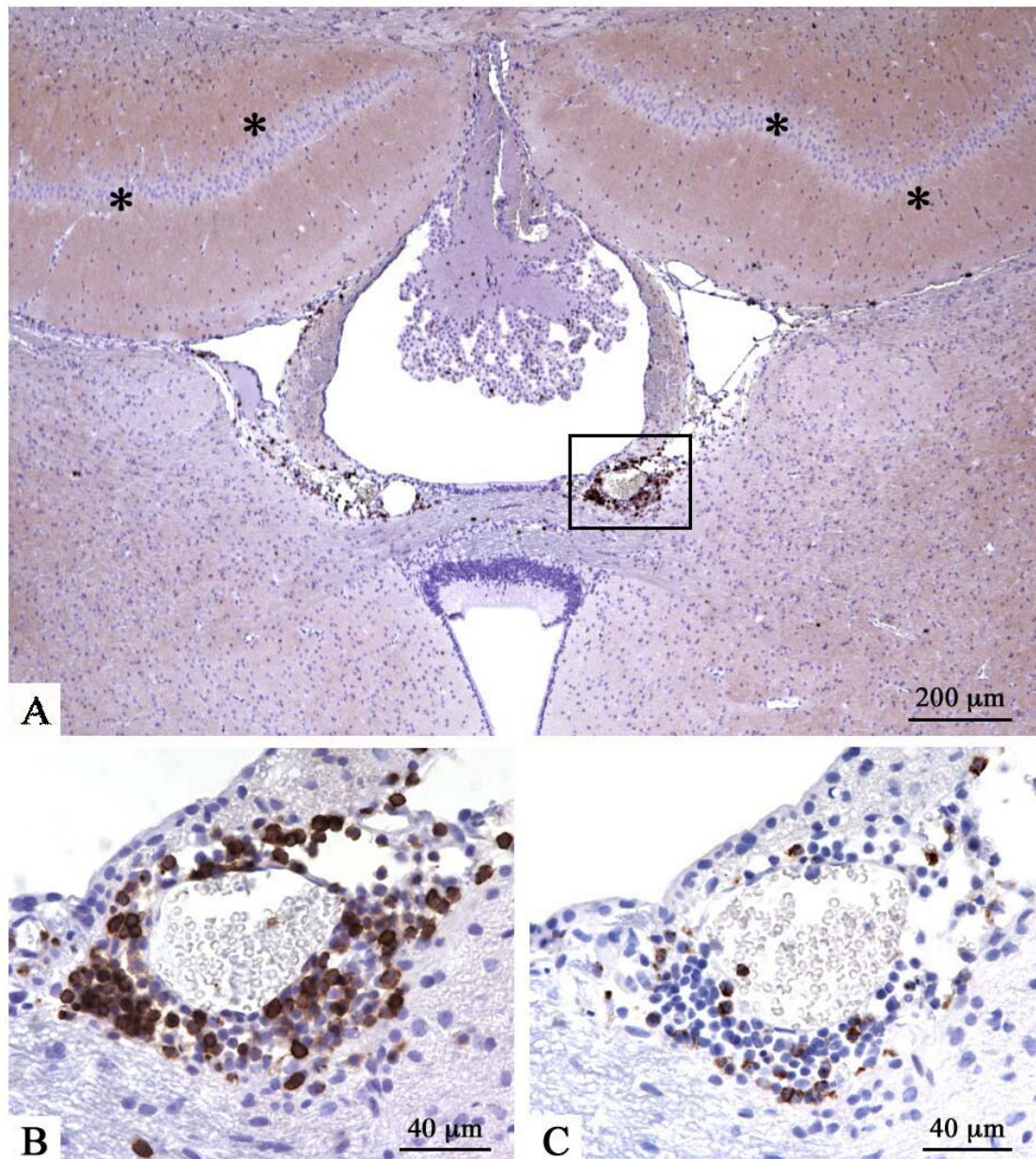


Abbildung 17: Pathologie nach T-Zell-Transfer oder Protein-Immunisierung mit Pnma1.



Vier Tage nach T-Zell-Transfer sind bis auf einige wenige meningeale Entzündungszellen keine Infiltrate detektierbar (**A-F**). Sechs (**F-J**) bzw. neun Tage (**K-O**) nach dem Transfer können deutliche meningeale und perivaskuläre Infiltrate bestehend aus Makrophagen (**G, L**) und T-Zellen (**H, M**) detektiert werden. Nach Proteinimmunisierung (**P-T**) bestehen die Infiltrate aus einigen wenigen perivaskulär lokalisierten Makrophagen (**Q**). T-Zellen (**R**) konnten nicht detektiert werden. Vergrößerung x485; Färbungen: **A, F, K, P**: HE; **B, G, L, Q**: ED1; **C, H, M, R**: w3/13; **D, I, N, S**: Ox6; **E, J, O, T**:  $\beta$ -Mikroglobulin.

Darüber hinaus konnte durch den Transfer rPnma1-spezifischer Zellen in männliche DA-Ratten gezeigt werden, dass die in weiblichen Tieren beobachtbare Enzephalitis in gleicher Intensität und Lokalisation auch in männlichen Tieren nachweisbar war. Die Pnma1-spezifische Enzephalitis ist folglich nicht geschlechtsabhängig, trotz der hohen Expression des Pnma1-Proteins in den Hoden der männlichen Tiere. Dies deckt sich ebenso mit den Beobachtungen aus der humanen Erkrankung, die sowohl bei Männern wie auch bei Frauen beobachtet werden kann.



**Abbildung 18: Histologie nach Transfer rPnma1-spezifischer Zellen in männlichen DA-Ratten**

Auch in männlichen DA-Ratten konnten pathologische Infiltrate detektiert werden, die insbesondere im Bereich des Mesencephalons lokalisiert waren (A) und sich aus T-Zellen (B) und Makrophagen (C) zusammensetzen. Quantitative oder qualitative Unterschiede im Gegensatz zu weiblichen DA-Ratten konnten nicht beobachtet werden.

## 4 Diskussion

Bislang ist die Pathogenese paraneoplastischer neurologischer Erkrankungen des ZNS nicht geklärt, insbesondere gibt es keinen Beweis für die vielfach favorisierte Autoimmunhypothese.

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals zeigen, dass der adoptive Transfer von CD4<sup>+</sup> Th1-Effektorzellen, die spezifisch gegen das autologe onkoneuronale Antigen Pnma1 bzw. rYo gerichtet sind, in der Lage ist, in den Empfängertieren eine Enzephalitis auszulösen. Diese verläuft bislang lediglich subklinisch, ist jedoch durch deutliche perivaskuläre, teilweise sogar parenchymal lokalisierte entzündliche Infiltrate gekennzeichnet, die in den untersuchten Tieren ähnlich lokalisiert sind, wie in den Patienten, die an einem anti-Ma/Ta bzw. anti-Yo assoziierten paraneoplastischem Syndrom leiden (Dalmau et al., 1999, Voltz et al., 1999, Rosenfeld et al., 2001).

Dass ein Transfer spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine entzündliche ZNS-Erkrankung auslösen kann war bisher nur für T-Zellen bekannt, die gegen Myelinbestandteile oder astrozytäre Antigene gerichtet waren (Kojima et al., 1994). Diese Arbeit zeigt erstmals, dass eine T-Zell Reaktivität gegen ein neuronales Antigen, das von paraneoplastischen Patienten spezifisch erkannte rPnma1 bzw. rYo, pathogen sein kann und in der Lage ist, im Tiermodell (DA Ratte) eine Enzephalitis zu induzieren.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei immunologischen Experimenten die Verwendung autologer Proteine von entscheidender Bedeutung ist: Zum einen konnte der Transfer spezifisch gegen das humane Yo Protein gerichteter CD4<sup>+</sup> Th1-Effektorzellen in den DA-Ratten keine histologisch detektierbaren Infiltrate auslösen. Hier konnte die erstmalige Klonierung der Ratten-Sequenz für rYo zeigen, dass das humane und das Ratten-Äquivalent des Yo-Proteins auf Aminosäureebene zu einem hohen Prozentsatz (85,7 %) identisch sind, die unterschiedlichen Aminosäuren jedoch in einem bestimmten Bereich kumulieren. Gegen das nun neu klonierte,

autologe rYo-Protein gerichtete CD4<sup>+</sup> Zellen hingegen waren ebenso wie die Pnma1-spezifischen Zellen auch in der Lage meningeale, perivaskuläre und vereinzelt sogar parenchymal lokalisierte Infiltrate in den Tieren zu induzieren.

Ein weiterer Hinweis für die Wichtigkeit der Verwendung autologer Proteine ist die relativ geringe Kreuzreaktivität zwischen humanem und Ratten Pnma1-Protein auf T- wie auch auf B-Zell-Ebene, bzw. die verminderte Kreuzreaktivität zwischen humanem und Ratten Yo auf T-Zell-Ebene, obwohl diese beiden Proteine auf Aminosäureebene zu 94% (Pnma1) bzw. 85,7% (Yo) identisch sind. Die Verwendung autologer Proteine ist dabei vermutlich insbesondere für die Durchbrechung der Toleranz von entscheidender Bedeutung. Bei allen bisherigen Versuchen, mittels der onkoneuronalen Antigene HuD und Yo ein Tiermodell zu etablieren wurden humane Proteine verwendet, dies könnte eine Erklärung für deren fehlenden Erfolg sein (Voltz R 2002, Tanaka K, 1994, Tanaka M, 1995, Sillevis-Smith 1995, Carpentier 1998).

Histopathologisch ist die durch rPnma1 spezifische Zellen induzierte Enzephalitis identisch mit einer EAE, die über adoptiven Transfer CD4<sup>+</sup> Th1-Effektorzellen ausgelöst wird, die gegen gliale (S100 $\beta$ ) oder Myelinproteine (MBP, PLP, MOG) gerichtet sind (Berger T, 1997). Jedoch ist die Entzündung in dem vorliegenden Modell im Gegensatz zu der EAE quantitativ deutlich geringer ausgeprägt. Darüber hinaus ist die anti-neuronale CD4<sup>+</sup> Aktivität offensichtlich nicht potent genug, um auch substantielle Defekte und konsekutiv eine klinisch manifeste Erkrankung zu induzieren. Eine ähnliche Konstellation wird in Lewis-Ratten nach adoptivem Transfer S100 $\beta$ - oder MOG-spezifischer T-Zellen beobachtet, die ebenso in einer histopathologisch deutlich detektierbaren entzündlichen ZNS-Reaktion, nicht jedoch in einem korrespondierenden klinischen Defizit resultiert (Kojima et al., 1994; Linington et al., 1993). Dabei ist das Potenzial einer T-Zellantwort gegen bestimmte ZNS-Antigene tatsächlich auch einen substanziellen Schaden auszulösen auch stark von dem Genotyp des Empfängertieres abhängig (Kawakami et al., 2004).

Interessanterweise konnte hier gezeigt werden, dass die Lokalisation der entzündlichen Infiltrate von dem Antigen abhängig ist, gegen das die T-Zellen gerichtet sind. Transferiert man gegen das insbesondere in Purkinje-Zellen

exprimierte Yo gerichtete T-Zellen sind die histopathologischen Veränderungen vor allem im Bereich des Kleinhirns und Hirnstammes lokalisiert. Dies entspricht in etwa der Verteilung bei Patienten mit einer anti-Yo assoziierten paraneoplastischen Erkrankung. Transferiert man hingegen T-Zellen, die gegen das panneuronal exprimierte PNMA1 gerichtet sind, so sind die histopathologischen Veränderungen insbesondere mesenzephal, aber auch im Bereich von Medulla oblongata, Diencephalon und Telencephalon inklusive Nucleus caudatus und Putamen lokalisiert.

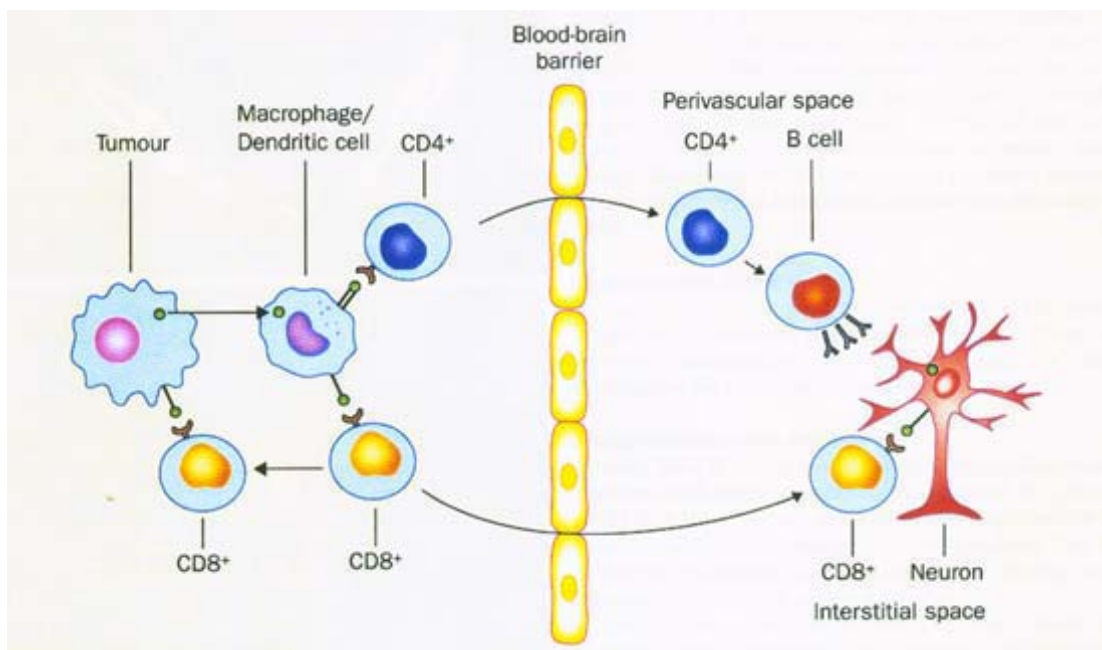
Korrespondierend dazu sind bei Patienten, die unter einem paraneoplastischen Syndrom leiden, das mit einer anti-Ma-Reaktivität assoziiert ist, vor allem Mesenzephalon und Diencephalon entzündlich infiltriert (Dalmau et al., 1999; Voltz et al., 1999; Rosenfeld et al., 2001). Interessanterweise gelang es in der vorliegenden Arbeit, diese unterschiedlichen Verteilungsmuster durch den Transfer gegen bestimmte neuronale Antigene gerichtete T-Zellen in der Ratte zu imitieren.

Weshalb es bei paraneoplastischen neurologischen Erkrankungen in Abhängigkeit von dem meist panneuronal exprimierten onkoneuronalen Zielantigen zu unterschiedlichen, meist für das jeweilige Antigen typischen Verteilungsmustern kommt ist nicht sicher geklärt. Während die neuronalen Antigene in allen Neuronen exprimiert sind, werden bestimmte Regionen wie limbisches System und Kleinhirn bevorzugt von paraneoplastischen Erkrankungen betroffen. Es konnte gezeigt werden, dass in bestimmten Nervenzellen wie beispielsweise hippocampalen Neuronen, oder Purkinje-Zellen MHC Klasse I in hohem Maße exprimiert wird (Corriveau et al., 1998). Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Neurone besonders empfindlich gegen autoimmune Attacken reagieren und für neuronale Degeneration besonders prädestiniert sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass eine gegen onkoneuronale Antigene gerichtete CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort pathogen sein kann, dies allein jedoch nicht ausreicht, um selektive neuronale Degeneration in dem Empfängertier zu verursachen. Ein Grund dafür könnte das gewählte Immunisierungsprotokoll sein. Die dadurch ausgelöste entzündliche T-Zell-Antwort

ist akut monophasisch und eventuell zeitlich nicht ausreichend lang, um klinisch bedeutsamen, irreversiblen neuronalen Schaden zu setzen.

Eine andere Hypothese ist, dass für die Induktion einer klinisch manifesten Erkrankung mehrere Ebenen der Immunantwort zusammenspielen müssen. Dabei impliziert die Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate aus CD4+, CD8+, B- und Plasmazellen im ZNS betroffener Patienten, eine kombinierte Zell- und humoral vermittelte Autoimmunreaktion (Wanschitz et al., 1997). In dem vorliegenden Modell wurde jedoch nur die Antikörper- bzw. die CD4+ Antwort getrennt voneinander untersucht, die alleine wohl für einen substanziellen Schaden nicht ausreichend ist (Abbildung 19), (Voltz et al., 2002).



**Abbildung 19: Autoimmunpathogenese paraneoplastischer Erkrankungen des zentralen Nervensystems (aus Voltz, The Lancet Neurology, 2002).**

Das ektop in den Tumorzellen exprimierte, intrazellulär lokalisierte onkoneuronale Antigen wird im Zuge des apoptotischen Zelltodes der Tumorzelle von lokalen dendritischen Zellen internalisiert und CD8+ sowie CD4+ T-Zellen präsentiert. Die CD8+ zytotoxischen T-Zellen erkennen nun auch das vom Neoplasma exprimierte Antigen als fremd und tragen somit zu der relativ guten Prognose des Tumors bei. Aktivierte CD4+ Zellen sind nun in der Lage, durch die Blut-Hirn-Schranke zu wandern und den perivaskulären Raum zu besiedeln. Dabei

unterstützen sie B-Zellen bei der intrathekalen Antikörperproduktion. Zudem sorgen sie für ein entzündungsförderndes Milieu und induzieren u.a. die Expression von MHC-I an der Oberfläche von Neuronen, die diese als Zielstruktur einer Antigen-spezifischen CD8+ zytotoxischen T-Zellantwort angreifbar macht.

Das Zusammenspiel verschiedener Immunmechanismen ist auch für die Pathogenese anderer Erkrankungen gut belegt. So ist zum Beispiel die durch Proteinimmunisierung induzierte MOG-EAE eine durch zwei verschiedene Komponenten ausgelöste Autoimmunreaktion: Die durch die MOG-Immunisierung generierten CD4+ Zellen sind in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu durchbrechen und eine Enzephalitis auszulösen. Die für die MOG-EAE so typische Demyelinisierung wird jedoch erst durch MOG-spezifische Antikörper vermittelt, die im Zuge der Proteinimmunisierung gebildet werden und in der Lage sind, durch die von reaktiven T-Zellen geöffnete Blut-Hirn-Schranke in das ZNS zu gelangen. Dort können sie dann die charakteristische Demyelinisierung vermitteln, die sich klinisch in einem zweiten Krankheitsschub der Tiere manifestiert (Linnington et al., 1988). Ähnlich sind auch bei paraneoplastischen Erkrankungen, wie beispielsweise Patienten mit anti-Ma oder anti-Ma2/Ta-Reaktivität, außer CD4+ Zellen auch andere Immunkomponenten an der destruktiven Immunreaktion gegen Neurone beteiligt und können im ZNS der Patienten nachgewiesen werden.

Die Entdeckung onkoneuronaler Antikörper in Liquor und Serum betroffener Patienten legte zunächst die Vermutung nahe, dass es sich auch bei paraneoplastischen Syndromen des zentralen Nervensystems um eine humoral vermittelte Erkrankung handelt, nicht zuletzt, da die Titer häufig mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Theoretisch sollten die hochtitrig nachweisbaren spezifischen anti-neuronalen Antikörper in der Lage sein, mit den auf der Oberfläche der Neuronen exprimierten Proteinen zu reagieren und dabei entweder Zelltod zu induzieren, oder mit der Funktion neuronaler Proteine zu interagieren (Tora et al., 1997). Typischerweise vermitteln Antikörper jedoch eine Immunantwort gegen extrazelluläre Strukturen, die immunologische Reaktion gegen intrazelluläre Proteine

wird hingegen in der Regel durch T-Zellen vermittelt. Onkoneuronale Antigene wie Yo und PNMA1 sind meist zytoplasmatisch oder nukleär lokalisiert und somit schwer verständlich, wie ein Autoantikörper gegen intrazelluläre Strukturen zelluläre Funktionen zerstören kann (Albert et al., 1998, Verschuuren et al., 1997). Dies macht eine direkt pathogene Rolle der Antikörper unwahrscheinlich, eine Beteiligung der Antikörper ist jedoch nicht auszuschließen. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Neurone in der Lage sind u.a. Antikörper in ihr Zytoplasma aufzunehmen (Borges et al., 1985, Fabian et al., 1987, Graus et al., 1991, Greenlee et al., 1993). Auch konnte eine intrathekale Synthese dieser Antikörper gezeigt werden, was auf eine aktive entzündliche intrazerebrale B-Zell-Reaktion hinweist. Die Vermutung, dass paraneoplastische neurologische Erkrankungen rein humoral vermittelt werden erscheint jedoch in zunehmendem Maße unwahrscheinlich: Zum einen bessert eine Reduktion der Antikörperspiegel wie beispielsweise durch Plasmapherese die klinische Symptomatik der Patienten nicht und auch der Versuch durch passiven Transfer von Antikörpern im Tiermodell eine Erkrankung zu induzieren war nicht erfolgreich (Graus et al., 1991). Ebenso war die in dieser Arbeit beschriebene Immunisierung mit den onkoneuronalen Antigenen hYo, rYo und rPnma1 trotz Induktion hoher Antikörperspiegel in den DA-Ratten nicht in der Lage, eine über diskrete meningeale Infiltrate hinausgehende Entzündungsreaktionen, oder gar neuronalen Schaden zu vermitteln. Diese Beobachtung deckt sich mit den bisher publizierten Daten mittels Proteinimmunisierung ein Tiermodell für paraneoplastische neurologische Erkrankungen zu generieren, die allesamt trotz hohem Antikörpertiter keinerlei histopathologische Veränderung zeigen konnten (Tanaka et al., 1994, Tanaka et al., 1995, Sillevs-Smith et al., 1995). Dies lässt vermuten, dass die Antikörperantwort an sich wohl nicht in der Lage ist, neuronalen Schaden zu setzen.

Die Aufnahme antineuronaler Antikörper in Neurone und Tumore konnte in einigen Fällen durchaus gezeigt werden, war jedoch nicht Fc-Rezeptor abhängig (Hormigo et al., 1996; Hormigo et al., 1994, Adamus et al., 1997). Zudem gibt es Hinweise dafür, dass die in Neuronen nukleär und zytoplasmatisch lokalisierten Hu-Proteine in kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Neuroblastomen an der



Zelloberfläche exprimiert werden und so die Interaktion mit dem Antikörper vermitteln. Ob für das einerseits transmembran im Tumor, andererseits nukleär in den Neuronen lokalisierte Protein alternatives Splicing verantwortlich ist, für die verschiedenen Proteine verschiedenen Gene kodieren oder das gleiche Protein sowohl in der Membran wie auch nukleär vorkommen kann ist noch nicht sicher geklärt (Tora et al., 1997).

Die Frage zur Zytotoxizität anti-Hu positiver Seren ergab widersprüchliche Ergebnisse. Einerseits konnte gezeigt werden, dass das Serum Hu+ Patienten toxisch auf Tumorzellen wirkt und sie in ihrem Wachstum hemmt (Verschuuren et al., 1996). Andererseits war das zytotoxische Potential anti-Hu positiver Seren in anderen Studien nicht (Hormigo et al., 1994) oder auch nach Entfernung der IgG-Fraktion aus dem Serum zu beobachten (Jaeckle et al., 1995). Die IgG-Fraktion alleine zeigte auch nach Zugabe von Komplement keinerlei Effekt (Greenlee et al., 1993 Schäfer et al., 2000), so dass die Mechanismen, die zu dem im Vergleich zu Kontrollseren erhöhtem zytotoxischen Potential führen weiter unklar sind. Auch konnte im Nervensystem von anti-Hu Patienten nur eine sehr schwache Komplement-Reaktion gefunden werden, obwohl das normalerweise Komplement-aktivierende IgG1 der prädominante Isotyp der anti-Hu Reaktion darstellt. Komplement-vermittelte Zytotoxizität scheint also kein Haupteffektormechanismus bei diesen Erkrankungen zu sein. Antikörper-vermittelte zelluläre Toxizität durch natürliche Killerzellen, die Zellen ohne MHC-Expression erkennt, scheint ebenso pathogenetisch wenig relevant zu sein, da im ZNS der Patienten keine NK detektiert werden konnten (Benyahia et al., 1999).

Eine andere Hypothese zur Existenz der anti-neuronalen Antikörper ist ihre Entstehung als sekundäres Phänomen im Rahmen der Gewebeerstörung. Auch dies wird in zunehmendem Masse unwahrscheinlich, da trotz panneuronaalem Schaden meist nur Reaktivität gegen *ein* neuronales Antigen nachweisbar ist und onkoneuronale Antikörper bei anderen neurologischen Erkrankungen mit Zelluntergang nicht auftreten.

Inwiefern diese Antikörper in der Beeinflussung des Tumorwachstums eine Rolle spielen ist nicht sicher geklärt. Nach Vakzinierung mit HuD-DNA konnte eine

deutliche Tumorregression beobachtet werden, welche jedoch zumindest teilweise durch zytotoxische T-Zellen verursacht ist, die neben der humoralen Immunantwort im Zuge der DNA Vakzinierung generiert werden. Hinweisend darauf ist einerseits die Infiltration der Tumore der vakzinierten Tiere mit CD3<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen sowie die fehlende Korrelation zwischen Ausmaß der Tumorreduktion und Höhe des Antikörper-Titers in den vakzinierten Tieren. Auch die Immunisierung mit HuD Antigen, die viel höhere Titer produzierte, war nicht in der Lage, das Tumorwachstum zu vermindern (Carpentier et al., 1998). Ob hierbei die Konformationsabhängigkeit der Antikörperreaktion gegen das native bzw. das denaturierte Protein oder die unterschiedliche Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen eine Rolle spielt ist ebenso nicht sicher geklärt.

Auch die in dieser Arbeit gezeigten Daten machen wahrscheinlich, dass onkoneuronale Antikörper Bestandteil der Immunreaktion sind, selbst jedoch kein pathogenes Potenzial besitzen. Denn trotz Induktion hoher Antikörper-Titer durch die Proteinimmunisierung zeigten die untersuchten Tiere keine histologischen Auffälligkeiten. Eine Koexistenz mit anderen potentiell pathogenen Antikörpern, die mit Membranantigenen reagieren und bisher dem immunhistochemischen Nachweis entgangen sind erscheint jedoch möglich (Vincent et al., 1998). So konnten beispielsweise bei 36% aller anti-Hu negativen Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom und paraneoplastischer Kleinhirndegeneration gegen VGCC gerichtete Antikörper im Serum nachgewiesen werden (Mason et al., 1997, Voltz et al., 1997).

Insgesamt mehren sich die Hinweise, dass eine spezifisch gegen ein Autoantigen gerichtete CD8<sup>+</sup> Antwort in der Lage ist, Autoimmunerkrankungen des ZNS zu vermitteln, wie beispielsweise gegen MPB gerichtete CD8<sup>+</sup> Zellen bei der EAE (Huseby et al., 2001). Dass CD8<sup>+</sup> Zellen im Rahmen paraneoplastischer neurologischer Erkrankungen in der Lage sind, Neurone direkt anzugreifen und zu zerstören konnte ebenso mehrfach gezeigt werden (Voltz et al., 1998; Albert et al., 1998; Benyahia et al., 1999; Plonquet et al., 2002; Neumann et al., 2002).

In den Patienten mit PND konnten gegen das jeweilige (Tumor)-Antigen gerichtete, expandierte CD8<sup>+</sup> zytotoxische Lymphozyten detektiert werden, nicht jedoch in Tumorpatienten ohne paraneoplastische neurologische Erkrankungen, auch wenn diese bestimmte Tumor-restringierte Antigene exprimierten (z. B. melanoma MAGE/MART Antigene) (Albert et al., 1998, Darnell et al., 2000). Die meisten Zellen, die in Blut und Liquor akut und chronisch an einem paraneoplastischem Syndrom erkrankter Patienten nachgewiesen werden konnten, sind klassische  $\alpha\beta$  T-Zellen mit typischem Th1 Sekretionsmuster (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2) (Albert et al., 2000), der gleiche Subtyp von T-Zellen, der in dieser Arbeit verwendet wurde.

Dabei wird die Tumor-induzierte Autoimmunität vermutlich durch die ektopische Expression onkoneuronaler Antigene durch den Tumor und Entwicklung einer CD8<sup>+</sup> Antwort induziert. Dabei spielt die effektive, MHC-I-restringierte Präsentation der Zielantigene apoptotischer, nicht jedoch vitaler Tumorzellen durch dendritische Zellen eine entscheidende Rolle und ist ein entscheidender Schritt in der Initiierung der Tumorummunologie und damit der Pathogenese paraneoplastischer neurologischer Erkrankungen (Albert et al., 1998, Albert et al., 1998, Sauter et al., 2000 Albert et al., 2000).

Die durch die ektopische Expression des neuronalen Antigens ebenso aktivierten autoaggressiven CD4<sup>+</sup> Th1 T-Zellen können zudem direkt zytotoxisch auf die Antigen-tragenden Tumorzellen wirken. Über positive Rückkopplungsmechanismen wird die immunologische Reaktion gegen den Tumor erneut getriggert und ist vermutlich für die bessere Tumorprognose verantwortlich (Benyahia et al., 1999). Die ektopische Expression eines onkoneuronalen Antigens alleine reicht jedoch nicht aus, um eine suffiziente Immunreaktion zu triggern. Wie bereits beschrieben exprimieren etwa 85% aller Tumore onkoneuronale Proteine (100% aller kleinzelligen Bronchialkarzinome exprimieren Hu (Manley et al., 1995, Dalmau et al., 1992), 60% aller Ovarialkarzinome und etwa 25% aller Mammakarzinome exprimieren Yo (Darnell et al., 2000)), die Inzidenz von paraneoplastischen neurologischen Erkrankungen ist jedoch sehr gering. Darüber hinaus sind nicht bei allen Patienten mit Antigen-tragendem Tumor auch anti-onkoneuronale Antikörper nachzuweisen. So

sind nur bei 15% der Patienten mit kleinzelligem, obligat Hu-exprimierendem Bronchialkarzinom niedrigtitrig Antikörper nachweisbar, ohne mit einer neurologischen Symptomatik assoziiert zu sein (Verschuuren et al., 1999). Die Detektion der Autoantikörpern korreliert hierbei mit einer deutlich besseren Tumorprognose und längeren Überlebenszeit (Graus et al., 1997, Dalmau et al., 1990).

Nicht jede anti-Tumorimmunologie ist also zwangsläufig mit Autoimmunität vergesellschaftet. Ein Grund für dieses Phänomen könnte der Einfluss unterschiedlicher HLA-Haplotypen auf die Entwicklung einer Immunantwort sein: Tumore, die mit einer paraneoplastischen Erkrankung assoziiert sind exprimieren häufig MHC-Proteine, die in anderen, nicht mit paraneoplastischen Erkrankungen vergesellschafteten Tumoren kaum je nachzuweisen sind. Die MHC-I Expression durch die Tumore scheint also Voraussetzung für die Entwicklung einer gegen das onkoneuronale Antigen gerichteten Immunantwort zu sein, weshalb Tumore mit fehlender bzw. niedriger Expression von MHC-I wohl einen Wachstumsvorteil sowie erhöhtes metastatisches Potential besitzen. Das Ausmaß der verminderten HLA-Expression korreliert dabei mit der histologischen Entdifferenzierung sowie einem fortgeschrittenen klinischem Stadium (Campoli et al., 2002). Auch fehlt mit PNS assoziierten Tumoren die Expression von Proteinen wie beispielsweise Fas Liganden, die T-Zell-Toleranz induzieren können (Strand et al., 1996). Weitere Faktoren sind die Nähe dendritischer Zellen zu apoptotischen Tumorzellen als Voraussetzung für suffiziente Antigen-Präsentation sowie das Fehlen anti-inflammatorischer Zytokine oder anderer suppressiver Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzellen. Zudem spielen CD4<sup>+</sup> Zellen bei der Entwicklung einer Immunantwort eine wesentliche Rolle, da ihre An- bzw. Abwesenheit in den Lymphknoten entscheiden dazu beiträgt, ob T-Zellen aktiviert werden oder Toleranz erzeugt wird (Albert et al., 2001). Bei einem Teil der Patienten mit paraneoplastischen neurologischen Syndromen konnte auch eine Expression von MHC-II Antigenen durch den Tumor nachgewiesen werden, so dass hier vermutlich tumoreigene Antigene präsentiert werden können und somit die Autoimmunreaktion initiiert wird. Die MHC-II exprimierenden Tumore

zeigten keine stärkeren Infiltrate als die MHC-II negativen Tumore, so dass es unwahrscheinlich ist, dass diese Expression ein sekundäres, durch die Entzündung bedingtes Zytokin-induziertes Phänomen ist (Dalmau et al., 1995).

In Zusammenschau der in dieser Arbeit gewonnenen sowie der bereits publizierten Daten erscheint es zunehmend wahrscheinlich, dass bei der Pathogenese paraneoplastischer neurologischer Erkrankungen des ZNS der selektive, teilweise ausgeprägte neuronale Schaden durch ein synergistisches Zusammenspiel von CD4+ und CD8+ T-Zellen vermittelt wird (Neumann et al., 2002; Albert et al., 1998; Benyahia et al., 1999, Plonquet et al., 2002).

Die derzeitige Hypothese zur Pathogenese ist, dass der Tumor ektop sogenannte onkoneuronale Antigene exprimiert, die in gleicher oder ähnlicher Form normalerweise ausschließlich in immunprivilegierten Organen wie ZNS, Hoden oder Retina vorhanden sind. Hier sind sowohl die Neurone wie auch die Keimzellen vom restlichen Körper durch eine Blut-Hirn- respektive eine Blut-Hoden-Schranke (McLay et al., 1997) getrennt. Durch die ektope Expression im Tumor wird das neuronale Antigen immunogen. Apoptotische Tumorzellen haben sich dabei als essentielle Trigger für die Kreuzpräsentation von Epitopen herausgestellt, da diese besonders effektiv von gewebeständigen dendritischen Zellen phagozytiert, prozessiert und die Epitope der internalisierten Zellen über MHC-I-Molekülen präsentiert werden (Albert et al., 1998). Dabei ist die Effizienz unreifer DC bezogen auf Phagozytosefähigkeit wie auch Antigenpräsentation wesentlich höher als die reifer DC (Albert et al., 1998). Nach ihrer Reifung wandern diese DC dann in die lokoregionären Lymphknoten und präsentieren dort naiven T-Zellen das prozessierte Antigen. Für die Einwanderung in die T-Zell-reiche Zone des Lymphknotens ist eine verstärkte Expression des Chemokinrezeptors CCR7 notwendig. Dendritische Zellen sind im Gegensatz zu anderen phagozytierenden Zellen wie beispielsweise Makrophagen, äußerst potente Stimulatoren von B- und T-Lymphozyten (Sauter et al., 2000, Albert et al., 1998). Die Kompetenz, das Antigen an die T-Zellen zu präsentieren setzt jedoch eine hohe Expression von MHC-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86, sowie Adhäsionsmolekülen wie

ICAM voraus. Die Anwesenheit CD4<sup>+</sup> Zellen in den Lymphknoten spielt hier vermutlich in Hinblick auf die Induktion einer suffizienten Tumorantwort eine wesentliche Rolle. Interessanterweise scheint es so zu sein, dass DC in Abwesenheit von CD4<sup>+</sup> Zellen das Antigen zwar an CD8<sup>+</sup> Zellen präsentieren, in diesen jedoch Toleranz induzieren, so dass diese nach einigen Zellteilungen einen apoptotischen Zelltod erleiden. In Anwesenheit von CD4<sup>+</sup> Zellen induziert der identische Mechanismus hingegen eine Aktivierung der CD8<sup>+</sup> Zellen (Albert et al., 1998b). CD4<sup>+</sup> Zellen spielen also in der Entwicklung einer Immunantwort eine wesentliche Rolle, da ihre An- bzw. Abwesenheit entscheidend ist, ob T-Zellen aktiviert oder toleriert werden.

Einmal aktiviert sind autoreaktive, gegen onkoneuronale Antigene gerichtete CD4<sup>+</sup> Th1 T-Zellen in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und eine Entzündung innerhalb des ZNS zu induzieren, auch das konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Dabei sezernieren die aktivierten T-Zellen im Rahmen dieser inflammatorischen Reaktion proinflammatorische Zytokine und Chemokine innerhalb des ZNS. Die initiale, CD4<sup>+</sup>-vermittelte entzündliche ZNS-Reaktion fördert das Einwandern zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in die Läsionen und die klonale Expansion autoreaktiver T-Zellen (Hickey et al., 1991). Über die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IFN- $\gamma$ , das die in dieser Arbeit verwendeten CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen in hohem Maße produzierten, wird zudem in Individuen mit bestimmtem genetischen Hintergrund eine verstärkte Expression von MHC-I-Molekülen auf der neuronalen Oberfläche induziert. Dieser Schritt ist Voraussetzung für die Angreifbarkeit der Neuronen durch gegen neuronale Antigene gerichtete CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Neumann et al., 1995).

Jedoch sind in dem immunprivilegierten ZNS die Immunreaktionen im Vergleich zu anderen Organen restringiert und angepasst. Dazu tragen zwei Hauptmechanismen bei: Zum einen verfügt das ZNS über eine Blut-Hirn-Schranke, die durch Astrozytenfüßchen und spezielle mikrovaskuläre Strukturen gebildet wird und das ZNS physikalisch von der umgebenden systemischen Blutzirkulation abgrenzt. Durch verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise die Produktion proinflammatorischer

Zytokine (u.a. TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ ) kann das Immunsystem diese Barriere bei bestimmten Erkrankungen durchbrechen.

Die zweite Komponente, die bei der immunprivilegierten Lage des ZNS eine wichtige Rolle spielt, sind molekulare Mechanismen. Lange Zeit konnten im ZNS keine MHC-Komplexe (Klasse I oder Klasse II) nachgewiesen werden. Diese Komplexe sind jedoch für eine suffiziente Präsentation intrazellulär lokalisierter Zielantigene an zytotoxische CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Th1 Zellen entscheidend (Haas et al., 1988; Neumann et al., 1997). Im gesunden ZNS finden invadierende T-Lymphozyten eine erwähnenswerte MHC-Expression wohl nur in den Meningen und perivaskulär vor. In vitro konnte eine Induzierbarkeit von MHC-I auf Neuronen beobachtet werden (Neumann et al., 1995), über die Situation in vivo herrschte lange Unklarheit. Neuere Studien jedoch zeigen, dass bestimmte Neurone durchaus in der Lage sind, sowohl MHC-I als auch MHC-II und somit antigenpräsentierende Moleküle zu exprimieren. Vermutlich genügt ein sehr geringer Teil der MHC-I Moleküle, der das antigene Peptid präsentiert, um eine Zelle als Zielstruktur für die Zerstörung durch MHC-I restringierte T-Zellen zu kennzeichnen (Christinck et al., 1991). Die bisher fehlende Detektion ist also möglicherweise auf temporäre und quantitative Expressionsunterschiede im Vergleich zu anderen Zellen zurückzuführen (Corriveau, 1998).

Mittlerweile weiß man auch, dass verschiedene Zellen des ZNS wohl im Rahmen entzündlicher und degenerativer ZNS-Erkrankungen über Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$  eine de novo Expression von MHC-Molekülen induzieren können (Vass et al., 1990). Dies stützt die Möglichkeit, dass über MHC-Komplexe T-Zell vermittelt intrazelluläre Proteine erkannt und Neurone attackiert werden können. Eine pathogenetische Rolle zytotoxischer T-Zellen, die im Rahmen paraneoplastischer neurologischer Erkrankungen in ZNS und Liquor betroffener Patienten detektiert werden konnten, erscheint also durchaus wahrscheinlich. Prinzipiell ist jedoch auch für Neurone ein nicht MHC-vermittelter Mechanismus denkbar, wie er bereits bei einer Schädigung der Oligodendrozyten durch CD4<sup>+</sup> Zellen gezeigt werden konnte (Sabelko et al., 1997).

Der Mechanismus einer Beteiligung CD8<sup>+</sup> Zellen könnte ein allgemeines Charakteristikum der Immunpathogenese T-Zell vermittelter entzündlicher ZNS-Erkrankungen sein, ist jedoch bislang nur sehr unvollständig verstanden. So konnte in letzter Zeit sowohl bei der Multiplen Sklerose (MS) wie auch bei den PND eine klonale Expansion von CD8<sup>+</sup> Zellen innerhalb des ZNS nachgewiesen werden. Dabei scheinen die CD8<sup>+</sup> Zellen bei der MS insbesondere den axonalen, vermutlich für die bleibenden neurologischen Defizite verantwortlichen Schaden zu vermitteln (Babbe et al., 2000; Bitsch et al., 2000; Jacobsen et al., 2002).

Für die Hypothese einer T-Zell vermittelten Erkrankung sprechen jedoch nicht nur die entzündlichen Infiltrate in Nervensystem und Tumor, die in ihrer Lokalisation im ZNS in etwa mit der klinischen Symptomatik korrelieren (Rosenblum, 1993, Wanschitz 1997). Viele Daten weisen stark darauf hin, dass die anti-Hu spezifische Immunantwort in Patienten mit anti-Hu Reaktivität und SCLC nicht nur eine B-Zell-Antwort ist, sondern auch spezifisch gegen HuD gerichtete CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen und CD25 exprimierende CD4<sup>+</sup> Zellen vom Th1 Typ involviert sind, die jeweils im Blut der Patienten nachgewiesen werden konnten (Benyahia et al., 1999). Auch spezifisch gegen das onkoneuronale Antigen cdr2 gerichtete zirkulierende zytotoxische T-Zellen konnten bei anti-Yo positiven Patienten mit paraneoplastischer Kleinhirndegeneration detektiert werden (Albert et al., 1998). Des Weiteren konnte durch Analyse der T-Zell-Rezeptoren in den entzündlichen Infiltraten von anti-Hu Patienten gezeigt werden, dass es sich dabei um ein limitiertes T-Zell-Rezeptor-Repertoire handelt mit oligoklonaler Expansion zytotoxischer CD8<sup>+</sup> Zellen. Dies spricht dafür, dass die detektierten T-Zellen nicht unspezifisch im Rahmen einer proinflammatorischen Umgebung, sondern Antigen-vermittelt angelockt worden sind und somit sehr für eine primär pathogene Rolle dieser T-Zellen (Voltz et al., 1998). In den entzündlichen Infiltraten der untersuchten Patienten mit anti-Hu Reaktivität konnten in den CD8<sup>+</sup> Zellen, die in unmittelbarerem Kontakt zu den Neuronen standen zudem eine Expression von TIA-1 nachgewiesen werden. Dieses Protein ist Bestandteil zytotoxischer Granula, die in CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit zytolytischem Potential oder natürlichen Killerzellen enthalten sind, so dass es aufgrund ihrer



Lokalisation wahrscheinlich ist, dass diese Zellen für den neuronalen Schaden verantwortlich sind. Ebenso konnten in den Läsionen von Patienten mit paraneoplastischer Enzephalomyelitis eine verstärkte Expression von ICAM-1 gezeigt werden. Komplementablagerungen oder eine erhöhte Expression von Apoptosemarkern waren hingegen nicht nachweisbar (Bernal et al., 2002). Weiterhin exprimierten die von diesen Zellen attackierten, im Rahmen der paraneoplastischen Erkrankung geschädigten sensorischen Neurone MHC Klasse I auf ihrer Oberfläche, was eine Voraussetzung einer suffizienten Antigen-Präsentation für CD8<sup>+</sup> Zellen ist (Plonquet et al., 2002). Diese Beobachtung wiederum stützt die Vermutung einer direkt pathogenen zytotoxischen Effektorfunktion der T-Zellen, die sowohl für den neuronalen Schaden wie auch für die Kontrolle des Tumorwachstums verantwortlich gemacht werden kann. Zum einen haben diese Zellen die Fähigkeit, intrazelluläre, prozessierte, über MHC Klasse I präsentierte onkoneuronale Antigene an der Oberfläche der Zelle zu erkennen. Die Antitumor-Immunität beinhaltet neben der MHC-vermittelten Erkennung von Antigenen durch T-Zellen auch kostimulatorische Signale und ist vermutlich der auslösende Mechanismus, warum diese Killerzellen dann auch Neurone erkennen und diese zerstören (Darnell et al., 1996). Insgesamt sind diese Mechanismen in der Pathogenese dieser therapeutisch aktuell unbefriedigenden Erkrankungen jedoch noch zu wenig verstanden.

Über Information über der Pathogenese der neurologischen Symptome hinaus könnte ein Tiermodell für paraneoplastische neurologische Erkrankungen einen wichtigen Ansatz für onkologische Fragestellungen darstellen. Anhand von PNS kann eine natürliche Tumorummunologie exzellent beobachtet werden, die erfolgreich durch auf Tumorzellen exprimierte Neuronen-spezifische Proteine getriggert wird. Die Kreuzreaktion mit neuronalen Antigenen führt jedoch auch zu der klinisch-neurologischen Symptomatik, die häufig erst dadurch zu einer Detektion des Tumors führt. Das sekundäre Phänomen einer neurologischen Autoimmunerkrankung macht hier die natürlich vorkommende Tumorummunologie erst evident. Derartige immunologische Mechanismen zu imitieren, was aufgrund des wachsenden Verständnisses bezüglich der molekularen Entstehung einer Immunantwort durchaus

möglich erscheint und daraus Ideen für zukünftige immuntherapeutische Tumorbehandlung zu gewinnen ist sicherlich ein sehr interessanter Ansatz in der onkologischen Therapie, nicht zuletzt aufgrund der meist wenig befriedigenden Wirkung konventioneller Radiochemotherapie. Dabei wird das Interesse an aktiver, T-Zell-vermittelter Immuntherapie immer größer, da es vermutlich diese T-Zellen sind, die das Tumorwachstum entscheidend kontrollieren (Schuler et al., 1997). Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen wäre zur Therapieoptimierung von entscheidender Bedeutung, da die in PND beobachtbare tumorspezifische Immunreaktion zu einer weit günstigeren Tumorprognose führt und vereinzelt einen Tumorregress zur Folge hat (Darnell et al., 1993).

Erste Studien konnten diese tumorspezifische Immunreaktion im Mausmodell imitieren. Hier schien es, dass die Vakzinierung mit DNA, kodierend für das humane onkoneuronale Protein HuD und damit die Induktion einer effektiven Immunreaktion gegen Autoantigene effektiv im Hinblick auf die erreichte Tumorreduktion und sicher im Hinblick auf potentiell neurologische Nebenwirkungen sei (Carpentier et al., 1998). Dass sich aus diesen Daten künftige Therapieoption in der onkologischen Behandlung ergeben könnten, muss nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit mit großer Vorsicht evaluiert werden:

Hier konnte gezeigt werden, dass sich die gegen autologe Tumorantigene gerichtete Immunantwort auch gegen das ZNS richten kann und in den immunisierten Tieren zu deutlichen, wenn auch nur subklinischen entzündlichen Infiltraten führt. Dies kann nur als Warnung vor zu leichtfertiger Verwendung neuronaler Proteine als Zielantigene einer immunologisch basierten Tumorthherapie interpretiert werden.

Dennoch ist eine weiterführende eingehende Analyse der Pathogenese dieser Erkrankungen insbesondere auch in der Onkologie absolut sinnvoll, da diese Erkrankungen derzeit das einzig verfügbare Modell einer natürlich vorkommenden, effektiven Tumorimmunologie darstellen, an denen pathogenetische Mechanismen und therapeutische Überlegungen studiert werden können.

## 5 Zusammenfassung

Bislang ist die Pathogenese paraneoplastischer neurologischer Erkrankungen des zentralen Nervensystems nicht vollständig geklärt. Insgesamt mehreren sich jedoch die Hinweise auf einen zu Grunde liegenden Autoimmunprozess. Nicht zuletzt die Entdeckung onkoneuronaler Antikörper in Blut und Liquor betroffener Patienten lässt vermuten, dass diese Autoantigene im Rahmen des Krankheitsprozesses angegriffen werden. Bislang gibt es jedoch keinen Beweis für die vielfach favourisierte Autoimmunhypothese, nicht zuletzt ist es bisher wiederholt nicht gelungen die Erkrankung im Tiermodell zu reproduzieren.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der adoptive Transfer spezifisch gegen die onkoneuronalen Proteine Pnma1 und rYo gerichteten CD4<sup>+</sup> Th1 T-Zellen in der Lage ist, in der DA-Ratte eine Enzephalomyelitis zu induzieren. Dazu wurden zunächst die korrespondierenden, bis dahin noch nicht bekannten Ratten-Antigene rPnma1 und rYo kloniert. Verglichen mit ihrem humanen Korrelat zeigte sich auf Aminosäureebene eine Übereinstimmung von 93,8% für das PNMA1 und 85,7% für das Yo Protein. Nach Immunisierung weiblicher Ratten mit dem entsprechenden Antigen wurden aus den drainierenden Lymphknoten ex vivo in vitro spezifische CD4<sup>+</sup> T<sub>H1</sub> T-Zelllinien gegen diese Proteine generiert. Es konnte schließlich gezeigt werden, dass der Transfer dieser Zellen in naiven Empfängertieren eine Enzephalitis induzieren kann, die nach histopathologischen und lokalisatorischen Kriterien der humanen Erkrankung sehr ähnlich ist. Diese bestand insbesondere aus perivaskulär, teilweise auch parenchymal lokalisierten T-Zellen und Makrophagen und war assoziiert mit Pnma1 vor allem im Mes- und Dienzephalon, assoziiert mit rYo vor allem im Kleinhirn lokalisiert. Ebenso wie es bei der mit anti- Ma oder anti-Yo assoziierten humanen Erkrankung keine Geschlechtsbevorzugung gibt, liess sich die Pnma1-assozierte Enzephalitis in männlichen und weibliche DA-Ratten induzieren. Die alleinige Immunisierung mit Protein resultierte zwar in hohen Antikörper-

Spiegeln, jedoch lediglich mit minimalen histopathologischen Veränderungen assoziiert.

Die Induktion entzündlicher ZNS-Veränderung nach Transfer rPnma1- bzw. rYo-spezifischer T-Zellen konnte erstmals zeigen, dass eine Autoimmunreaktion gegen ein neuronales Antigen pathogen sein kann und stützt damit die Autoimmun- und T-Zell-Hypothese bei der Pathogenese dieser Erkrankungen.

## 6 ~~leut~~ribis

Adamus G, Machnicki M, Elerding H, Sugden B, Blocker YS, Fox DA  
Antibodies to recoverin induce apoptosis of photoreceptor and bipolar cells in vivo.  
J Autoimmun. 1998 Oct;11(5):523-33.

Adamus G, Machnicki M, Seigel GM.  
Apoptotic retinal cell death induced by antirecoverin autoantibodies of cancer-  
associated retinopathy.  
Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997 Feb;38(2):283-91.

Albert ML, Austin LM, Darnell RB.  
Detection and treatment of activated T cells in the cerebrospinal fluid of patients with  
paraneoplastic cerebellar degeneration.  
Ann Neurol. 2000 Jan;47(1):9-17

Albert ML, Darnell JC, Bender A, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell RB.  
Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration.  
Nat Med. 1998a Nov;4(11):1321-4.

Albert ML, Sauter B Bhardwaj N  
Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I restricted CTLs  
Nature 1998b, 393; 86-89

Antoine JC, Cinotti L, Tilikete C, Bouhour F, Camdessanche JP, Confavreux C,  
Vighetto A, Renault-Mannel V, Michel D, Honnorat J.  
[18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the diagnosis of cancer in  
patients with paraneoplastic neurological syndrome and anti-Hu antibodies.

Ann Neurol. 2000 Jul;48(1):105-8.

Auf G, Chen L, Fornes P, Le Clanche C, Delattre JY, Carpentier AF  
CpG-oligodeoxynucleotide rejection of a neuroblastoma in A/J mice does not induce a  
paraneoplastic disease.

Neurosci Lett. 2002 Jul 26;327(3):189-92.

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M,  
Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K.  
Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple  
sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain  
reaction.

J Exp Med 2000;192:393-404.

Bauer J, Bradl M, Klein M, Leisser M, Deckwerth TL, Wekerle H, Lassmann H.  
Endoplasmic reticulum stress in PLP-overexpressing transgenic rats: gray matter  
oligodendrocytes are more vulnerable than white matter oligodendrocytes.

J Neuropathol Exp Neurol 2002;61:12-22.

Benyahia B, Liblau R, Merle-Beral H, Tourani JM, Dalmau J, Delattre JY.  
Cell-mediated autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes with anti-Hu  
antibodies.

Ann Neurol. 1999 Feb;45(2):162-7.

Berger T, Weerth S, Kojima K, Linington C, Wekerle H, Lassmann H.  
Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T  
lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral  
nervous system.

Lab Invest 1997;76:355-64.

Bernal F, Graus F, Pifarre A, Saiz A, Benyahia B, Ribalta T.

Immunohistochemical analysis of anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis.

Acta Neuropathol (Berl). 2002 May;103(5):509-15. Epub 2002 Jan 31

Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W.

Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation.

Brain 2000;123:1174-83.

Borges LF, Busis NA.

Intraneuronal accumulation of myeloma proteins.

Arch Neurol. 1985 Jul;42(7):690-4.

Brehm U, Piddlesden SJ, Gardinier MV, Linington C.

Epitope specificity of demyelinating monoclonal autoantibodies directed against the human myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG).

J Neuroimmunol 1999;97:9-15.

Carpentier AF, Rosenfeld MR, Delattre JY, Whalen RG, Posner JB, Dalmau J.

DNA vaccination with HuD inhibits growth of a neuroblastoma in mice.

Clin Cancer Res. 1998 Nov;4(11):2819-24.

Christinck ER, Luscher MA, Barber BH, Williams DB.

Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis.

Nature. 1991 Jul 4;352(6330):67-70

Constant SL, Bottomly K

Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches

Annu Rev Immunol. 1997;15:297-322.

Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ.

Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity.

Neuron. 1998 Sep;21(3):505-20.

Dalmau J, Furneaux HM, Cordon-Cardo C, Posner JB.

The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues.

Am J Pathol. 1992 Oct;141(4):881-6.

Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB.

Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer - a quantitative western blot analysis.

Ann Neurol. 1990 May;27(5):544-52.

Dalmau J, Graus F, Cheung NK, Rosenblum MK, Ho A, Canete A, Delattre JY, Thompson SJ, Posner JB.

Major histocompatibility proteins, anti-Hu antibodies, and paraneoplastic encephalomyelitis in neuroblastoma and small cell lung cancer.

Cancer. 1995 Jan 1;75(1):99-109.

Dalmau J, Gultekin HS, Posner JB.

Paraneoplastic neurologic syndromes: pathogenesis and physiopathology.

Brain Pathol. 1999 Apr;9(2):275-84. Review.

Dalmau J, Gultekin SH, Voltz R, Hoard R, DesChamps T, Balmaceda C, Batchelor T, Gerstner E, Eichen J, Frennier J, Posner JB, Rosenfeld MR.



Ma1, a novel neuron- and testis-specific protein, is recognized by the serum of patients with paraneoplastic neurological disorders.

Brain. 1999 Jan;122 ( Pt 1):27-39.

Dalmau JO, Posner JB.

Paraneoplastic syndromes.

Arch Neurol. 1999 Apr;56(4):405-8. Review.

Darnell JC, Albert ML, Darnell RB.

Cdr2, a target antigen of naturally occurring human tumor immunity, is widely expressed in gynecological tumors.

Cancer Res. 2000 Apr 15;60(8):2136-9.

Darnell RB

Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders at the intersection of cancer, immunity, and the brain.

Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93:4529-4536

Darnell RB, DeAngelis LM.

Regression of small-cell lung carcinoma in patients with paraneoplastic neuronal antibodies.

Lancet. 1993 Jan 2;341(8836):21-2.

Darnell RB, Posner JB.

Observing the invisible: successful tumor immunity in humans.

Nat Immunol 2003a;4:201.

Darnell RB, Posner JB.

Paraneoplastic syndromes involving the nervous system.

N Engl J Med 2003b;349:1543-54.

Dropcho EJ:

Paraneoplastic diseases of the nervous system.

Curr Treat Opin Neurol 1999 Nov;1(5):417-427

Dropcho EJ.

Remote neurologic manifestations of cancer.

Neurol Clin 2002 Feb;20(1):85-122

Dudley ME, Rosenberg SA.

Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer.

Nat Rev Cancer 2003;3:666-75.

Fabian RH, Petroff G.

Intraneuronal IgG in the central nervous system: uptake by retrograde axonal transport.

Neurology. 1987 Nov;37(11):1780-

Fathallah-Shaykh H, Wolf S, Wong E, Posner JB, Furneaux HM.

Cloning of a leucine-zipper protein recognized by the sera of patients with antibody-associated paraneoplastic cerebellar degeneration.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Apr 15;88(8):3451-4.

Finn OJ

Cancer vaccines: between the idea and the reality.

Nat Rev Immunol. 2003 Aug;3(8):630-41.

Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H.

Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis.

Immunity. 2001 May;14(5):547-60.

Foley KP, Leonard MW, Engel JD.

Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction.

Trends Genet. 1993 Nov;9(11):380-5. Review.

Forsyth PA, Dalmau J, Graus F, Cwik V, Rosenblum MK, Posner JB.

Motor neuron syndromes in cancer patients.

Ann Neurol. 1997 Jun;41(6):722-30.

Gasser DL, Newlin CM, Palm J, Gonatas NK.

Genetic control of susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in rats.

Science. 1973 Aug 31;181(102):872-3.

Giometto B, 1997 Giometto B, Marchiori GC, Nicolao P, Scaravilli T, Lion A, Bardin PG, Tavolato B

Sub-acute cerebellar degeneration with anti-Yo autoantibodies: immunohistochemical analysis of the immune reaction in the central nervous system.

Neuropathol Appl Neurobiol. 1997 Dec;23(6):468-74

Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB

Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer.

Neurology 1985; 35:538-543

Graus F, Dalmau J, Rene R, Tora M, Malats N, Verschuuren JJ, Cardenal F, Vinolas N, Garcia del Muro J, Vadell C, Mason WP, Rosell R, Posner JB, Real FX.

Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival.

J Clin Oncol. 1997 Aug;15(8):2866-72.

Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, Honnorat J, Smitt PS, Vedeler Ch, Verschuuren JJ, Vincent A, Voltz R.

Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004 Aug;75(8):1135-40.

Graus F, Keime-Guibert F, Rene R, Benyahia B, Ribalta T, Ascaso C, Escaramis G, Delattre JY.

Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients.

Brain. 2001 Jun;124(Pt 6):1138-48

Graus F, Illa I, Agusti M, Ribalta T, Cruz-Sanchez F, Juarez C.

Effect of intraventricular injection of an anti-Purkinje cell antibody (anti-Yo) in a guinea pig model.

J Neurol Sci. 1991 Nov;106(1):82-7.

Graus F, Rene R.

Clinical and pathological advances on central nervous system paraneoplastic syndromes.

Rev Neurol (Paris). 1992;148(6-7):496-501. Review.

Graus F, Ribalta T, Campo E, Monforte R, Urbano A, Rozman C.

Immunohistochemical analysis of the immune reaction in the nervous system in paraneoplastic encephalomyelitis.

Neurology. 1990 Feb;40(2):219-22.

Graus F, Vega F, Delattre JY, Bonaventura I, Rene R, Arbaiza D, Tolosa E.

Plasmapheresis and antineoplastic treatment in CNS paraneoplastic syndromes with antineuronal autoantibodies.

Neurology. 1992 Mar;42(3 Pt 1):536-40.

Greenlee JE, Parks TN, Jaeckle KA

Type IIa ('anti-Hu') antineuronal antibodies produce destruction of rat cerebellar granule neurons in vitro.

Neurology. 1993 Oct;43(10):2049-54.

Haas GG Jr, D'Cruz OJ, De Bault LE.

Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis.

Am J Reprod Immunol Microbiol. 1988 Oct;18(2):47-51.

Hainfellner JA, Kristoferitsch W, Lassmann H, Bernheimer H, Neisser A, Drlicek M, Beer F, Budka H.

T-cell-mediated ganglionitis associated with acute sensory neuronopathy.

Ann Neurol. 1996;39:543-7.

Happ MP, Wettstein P, Dietzschold B, Heber-Katz E.

Genetic control of the development of experimental allergic encephalomyelitis in rats.

Separation of MHC and non-MHC gene effects.

J Immunol. 1988 Sep 1;141(5):1489-94.

Hart IK, Maddison P, Newsom-Davis J, Vincent A, Mills KR.

Phenotypic variants of autoimmune peripheral nerve hyperexcitability.

Brain. 2002 Aug;125(Pt 8):1887-95.

Hainfellner JA, Kristoferitsch W, Lassmann H, Bernheimer H, Neisser A, Drlicek M, Beer F, Budka H.

T-cell-mediated ganglionitis associated with acute sensory neuronopathy.

Ann Neurol. 1996;39:543-7.

Hickey WF

Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation.

Brain Pathol. 1991 Jan;1(2):97-105

Hickey WF, Hsu BL, Kimura H.

T-lymphocyte entry into the central nervous system.

J Neurosci Res. 1991 Feb;28(2):254-60.

Hormigo A, Lieberman F.

Nuclear localization of anti-Hu antibody is not associated with in vitro cytotoxicity.

J Neuroimmunol. 1994 Dec;55(2):205-12

Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J.

A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis.

J Exp Med. 2001;194:669-76.

Jaeckle KA.

Autoimmune mechanisms in the pathogenesis of paraneoplastic nervous system disease.

Clin Neurol Neurosurg. 1995 Feb;97(1):82-8

Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, Schock S, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B.

Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients.

Brain 2002;125:538-50.

Jean WC, Dalmau J, Ho A, Posner JB.

Analysis of the IgG subclass distribution and inflammatory infiltrates in patients with anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis.

Neurology. 1994 Jan;44(1):140-7

Kawakami N, Lassmann S, Li Z, Odoardi F, Ritter T, Ziemssen T, Klinkert WE, Ellwart JW, Bradl M, Krivacic K, Lassmann H, Ransohoff RM, Volk HD, Wekerle H, Linington C, Flugel A.

The Activation Status of Neuroantigen-specific T Cells in the Target Organ Determines the Clinical Outcome of Autoimmune Encephalomyelitis.

J Exp Med. 2004;199:185-97.

Keime-Guibert F, Graus F, Fleury A, Rene R, Honnorat J, Broet P, Delattre JY.

Treatment of paraneoplastic neurological syndromes with antineuronal antibodies (Anti-Hu, anti-Yo) with a combination of immunoglobulins, cyclophosphamide, and methylprednisolone.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2000 Apr;68(4):479-82.

Keime-Guibert F, Graus F, Broet P, Rene R, Molinuevo JL, Ascaso C, Delattre JY.

Clinical outcome of patients with anti-Hu-associated encephalomyelitis after treatment of the tumor.

Neurology. 1999 Nov 10;53(8):1719-23.

Kojima K, Berger T, Lassmann H, Hinze-Selch D, Zhang Y, Gehrman J, Reske K, Wekerle H, Linington C.

Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia.

J Exp Med. 1994 Sep 1;180(3):817-29.

Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H.

Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 2000;157:267-76.

Linington C, Berger C, Perry L, Weerth S, Hinze-Selch D, Zhang Y, Lu H, Lassmann H, Wekerle H.

T cells specific for the myelin-oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol* 1993;23: 1364-72.

Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K.

Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 1988;130:443-54.

Linke R, Schroeder M, Helmberger T, Voltz R.

Antibody-positive paraneoplastic neurologic syndromes: value of CT and PET for tumor diagnosis. *Neurology*. 2004 Jul 27;63(2):282-6

Maeda A, Maeda T, Ohguro H, Palczewski K, Sato N:

Vaccination with recoverin, a cancer-associated retinopathy antigen, induces autoimmune retinal dysfunction and tumor cell regression in mice. *Eur J Immunol* 2002 Aug;32(8):2300-7

Manley GT, Smitt PS, Dalmau J, Posner JB.

Hu antigens: reactivity with Hu antibodies, tumor expression, and major immunogenic sites.



Ann Neurol. 1995 Jul;38(1):102-10.

Mason WP, Graus F, Lang B, Honnorat J, Delattre J-Y, Valldeoriola F, Antoine JC, Rosenblum MK, Rosenfeld MR, Newson-Davis J, Posner JB, Dalmau J  
Small-cell lung cancer, paraneoplastic cerebellar degeneration and the Lambert-Eaton myasthenic syndrome

Brain 1997, 120, 1279-1300

McLay RN, Banks WA, Kastin AJ.

Granulocyte macrophage-colony stimulating factor crosses the blood-testis barrier in mice.

Biol Reprod. 1997 Oct;57(4):822-6.

McLay RN, Kimura M, Banks WA, Kastin AJ

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor crosses the blood--brain and blood--spinal cord barriers.

Brain. 1997 Nov;120 ( Pt 11):2083-91.

Mosmann TR, Sad S

The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more

Immunol Today. 1996 Mar;17(3):138-46

Neumann H, Cavalie A, Jenne DE, Wekerle H.

Induction of MHC class I genes in neurons.

Science 1995;269:549-52.

Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H.

Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases.

Trends Neurosci 2002;25:313-9.

Neumann H, Schmidt H, Cavalie A, Jenne D, Wekerle H.

Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha.

J Exp Med. 1997 Jan 20;185(2):305-16.

Panegyres PK, Reading MC, Esiri MM.

The inflammatory reaction of paraneoplastic ganglionitis and encephalitis: an immunohistochemical study.

J Neurol 1993;240:93-7.

Plonquet A, Gherardi RK, Creange A, Antoine JC, Benyahia B, Grisold W, Drlicek M, Dreyfus P, Honnorat J, Khouatra C, Rouard H, Authier FJ, Farcet JP, Delattre JY, Delfau-Larue MH.

Oligoclonal T-cells in blood and target tissues of patients with anti-Hu syndrome.

J Neuroimmunol 2002;2:100-5.

Posner JB.

Paraneoplastic syndromes.

In: Posner JB. Neurological complications of cancer. Contemporary Neurological Series, FA Davis 1995: 353-85

Rees JH, Hain SF, Johnson MR, Hughes RA, Costa DC, Ell PJ, Keir G, Rudge P.

The role of [18F]fluoro-2-deoxyglucose-PET scanning in the diagnosis of paraneoplastic neurological disorders.

Brain. 2001 Nov;124(Pt 11):2223-31.

Rojas I, Graus F, Keime-Guibert F, Rene R, Delattre JY, Ramon JM, Dalmau J, Posner JB.

Long-term clinical outcome of paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibodies.

Neurology. 2000 Sep 12;55(5):713-5.

Rosenblum MK.

Paraneoplasia and autoimmunologic injury of the nervous system: the anti-Hu syndrome.

Brain Pathol. 1993 Jul;3(3):199-212. Review.

Rosenfeld MR, Dalmau J.

Current Therapies for Paraneoplastic Neurologic Syndromes.

Curr Treat Options Neurol. 2003 Jan;5(1):69-77

Rosenfeld MR, Eichen JG, Wade DF, Posner JB, Dalmau J.

Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins.

Ann Neurol 2001;50:339-48.

Sakai K Shirakawa T, Kitagawa Y, Li Y, Hirose G:

Induction of cytotoxic T lymphocytes specific for paraneoplastic cerebellar degeneration-associated antigen in vivo by DNA immunization.

J Autoimmun 2001 Dec;17(4):297-302

Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N

Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells.

J Exp Med. 2000 Feb 7;191(3):423-34.

Schafer KH, Klotz M, Mergner D, Mestres P, Schimrigk K, Blaes F.

IgG-mediated cytotoxicity to myenteric plexus cultures in patients with paraneoplastic neurological syndromes.

J Autoimmun. 2000 Dec;15(4):479-84.

Schmid AH, Riede UN.

A morphometric study of the cerebellar cortex from patients with carcinoma. A contribution on quantitative aspects in carcinotoxic cerebellar atrophy.

Acta Neuropathol (Berl). 1974;28(4):343-52.

Schuler G, Steinman RM.

Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors.

J Exp Med. 1997 Oct 20;186(8):1183-7.

Sharshar T, Auriant I, Dorandeu A, Saghatchian M, Belec L, Benyahia B, Mabro M, Raphael JC, Gajdos P, Delattre JY, Gray F.

Association of herpes simplex virus encephalitis and paraneoplastic encephalitis - a clinico-pathological study.

Ann Pathol. 2000 May;20(3):249-52.

Sillevis Smitt PA, Manley GT, Posner JB

Immunization with the paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD does not cause neurologic disease in mice.

Neurology 1995; 45:1873-1878

Stefflerl A, Brehm U, Linington C.

The myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG): a model for antibody-mediated demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis.

J Neural Transm Suppl. 2000;(58):123-33. Review.

Stefflerl A, Brehm U, Storch M, Lambracht-Washington D, Bourquin C, Wonigeit K, Lassmann H, Linington C.

Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the "resistant" Brown Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B cell response  
J Immunol. 1999 Jul 1;163(1):40-9.

Stepaniak JA, Gould KE, Sun D, Swanborg RH.  
A comparative study of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis and DA rats.  
J Immunol. 1995 Sep 1;155(5):2762-9.

Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR  
Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells-- a mechanism of immune evasion?  
Nat Med. 1996 Dec;2(12):1361-6.

Sutton IJ, Fursdon Davis CJ, Esiri MM, Hughes S, Amyes ER, Vincent A.  
Anti-Yo antibodies and cerebellar degeneration in a man with adenocarcinoma of the esophagus.  
Ann Neurol. 2001 Feb;49(2):253-7.

Tan KO, Tan KM, Chan SL, Yee KS, Bevort M, Ang KC, Yu VC.  
MAP-1, a novel proapoptotic protein containing a BH3-like motif that associates with Bax through its Bcl-2 homology domains.  
J Biol Chem 2001;276:2802-7.

Tanaka K, Tanaka M, Inuzuka T, Nakano R, Tsuji S.  
Cytotoxic T lymphocyte-mediated cell death in paraneoplastic sensory neuronopathy with anti-Hu antibody.  
J Neurol Sci. 1999 Mar 1;163(2):159-62.

Tanaka K, Tanaka M, Onodera O, Igarashi S, Miyatake T, Tsuji S.  
Passive transfer and active immunization with the recombinant leucine-zipper (Yo) protein as an attempt to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration.  
J Neurol Sci. 1994 Dec 20;127(2):153-8.

Tanaka M, Tanaka K, Onodera O, Tsuji S  
Trial to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody. 1. Mouse strains bearing different MHC molecules produce antibodies on immunization with recombinant Yo protein, but do not cause Purkinje cell loss.  
Clin Neurol Neurosurg 1995; 97:95-100

Tanaka M, Tanaka K.  
HLA A24 in paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody.  
Neurology. 1996 Aug;47(2):606-7.

Tanaka M, Tanaka K, Shinozawa K, Idezuka J, Tsuji S  
Cytotoxic T cells react with recombinant Yo protein from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibody.  
J Neurol Sci. 1998 Nov 26;161(1):88-90.

Tora M, Graus F, de Bolos C, Real FX.  
Cell surface expression of paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy-associated Hu antigens in small-cell lung cancers and neuroblastomas.  
Neurology 1997;48:735-41.

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L.  
Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis.  
N Engl J Med 1998;338:278-85.

Uchuya M, Graus F, Vega F, Rene R, Delattre JY.

Intravenous immunoglobulin treatment in paraneoplastic neurological syndromes with antineuronal autoantibodies.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1996 Apr;60(4):388-92

Uchuya M, Fleury A, Graus F, Costagliola D, Liblau R, Merle-Beral H, Theodorou I, Delattre JY.

Lack of association between human leukocyte antigens and the anti-Hu syndrome in patients with small-cell lung cancer.

Neurology. 1998 Feb;50(2):565-6

Vass K, Lassmann H.

Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system.

Am J Pathol. 1990 Oct;137(4):789-800.

Verschuuren J, Chuang L, Rosenblum MK, Lieberman F, Pryor A, Posner JB, Dalmau J.

Inflammatory infiltrates and complete absence of Purkinje cells in anti-Yo-associated paraneoplastic cerebellar degeneration.

Acta Neuropathol (Berl). 1996;91(5):519-25.

Verschuuren JJ, Dalmau J, Hoard R, Posner JB.

Paraneoplastic anti-Hu serum: studies on human tumor cell lines.

J Neuroimmunol. 1997 Nov;79(2):202-10.

Verschuuren JJ, Perquin M, ten Velde G, De Baets M, Vriesman PB, Twijnstra A.

Anti-Hu antibody titre and brain metastases before and after treatment for small cell lung cancer.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1999 Sep;67(3):353-7.

Vincent A, Honnorat J, Antoine JC, Giometto B, Dalmau J, Lang B.  
Autoimmunity in paraneoplastic neurological disorders.  
J Neuroimmunol. 1998 Apr 1;84(1):105-9.

Voltz R:

Paraneoplastic neurological syndromes: an update on diagnosis, pathogenesis and  
therapie;  
Lancet Neurology 2002; !:294-305

Voltz R, Dalmau J, Posner JB, Rosenfeld MR.

T-cell receptor analysis in anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis.  
Neurology. 1998 Oct;51(4):1146-50.

Voltz R, Gultekin SH, Rosenfeld MR, Gerstner E, Eichen J, Posner JB, Dalmau J.  
A serologic marker of paraneoplastic limbic and brain-stem encephalitis in patients  
with testicular cancer.  
N Engl J Med. 1999 Jun 10;340(23):1788-95.

Voltz RD, Posner JB, Dalmau J, Graus F.

Paraneoplastic encephalomyelitis: an update of the effects of the anti-Hu immune  
response on the nervous system and tumour.  
J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1997 Aug;63(2):133-6. Review.

Wanschitz J, Hainfellner JA, Kristoferitsch W, Drlicek M, Budka H.

Ganglionitis in paraneoplastic subacute sensory neuronopathy: a morphologic study.  
Neurology. 1997 Oct;49(4):1156-9.



Weissert R, Wallstrom E, Storch MK, Stefferl A, Lorentzen J, Lassmann H, Linington C, Olsson T.

MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats.  
J Clin Invest. 1998 Sep 15;102(6):1265-73.

Wekerle H, Bradl M, Linington C, Kaab G, Kojima K.

The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus.  
Immunol Rev. 1996 Feb;149:231-43

Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C.

Animal models.

Ann Neurol. 1994;36 Suppl:S47-53



## 7 ~~Ab~~hang

### 1 ~~W~~ängen

a.a.	Aminosäure
ADCC	Antikörperabhängige Zytotoxizität
AP	alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
BBB	Blut-Hirnschranke (blood brain barrier)
BN	Brown Norway
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CFA	komplettes Freundesches Adjuvans
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel)
CMT	Komplement-vermittelte Zytotoxizität
ConA	Concanavalin A
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CT	Computertomographie
DA	Dark Agouti
DC	dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
d.p.i.	Tage nach Immunisierung

EAE	experimentelle autoimmune Enzephalitis
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetacid
EH	Eagles HEPES
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbant assay
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FCS	fetales Kälberserum
FDG	[18F] Fluorodesoxyglukose
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	humanes Leukozytenantigen
HP	horseradish peroxidase
HS	Pferdeserum
IFA	inkomplettes Freundesches Adjuvans
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -Thiogalaktosid
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LEMS	Lambert Eaton Myasthenes Syndrom
LEW	Lewis
M	molar
MG	Myasthenia gravis
mM	millimolar
MBP	basisches Myelinprotein
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter

---

MOG	Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
mRNA	Boten-RNA
ng	Nanogramm
NK	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge x
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCD	Paraneoplastische Kleinhirndegeneration
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PLE	Paraneoplastische Limbische Encephalitis
PLP	Proteolipidprotein
PND	Paraneoplastische neurologische Erkrankung
PNMA	paraneoplastisches Ma-Protein
PNS	Paraneoplastische neurologische Erkrankung des ZNS
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion
s.c.	subcutan
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom

SDS	Sodium dodecyl sulfat
TBS	Tris gepufferte Saline
TBE	Tris-Borat/EDTA
TCGF	T-Zellen Wachstumsfaktor
TCR	T-Zell Rezeptor
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF	Tumor Wachstumsfaktor
T <sub>H</sub>	T-Helfer Zelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris/Cl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan titriert mit HCl
U	Einheit
UV	ultraviolet
V	Volt
VGCC	spannungsabhängiger Kalziumkanal
VGKC	spannungsabhängiger Kaliumkanal
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7.2 Publikationen, die aus dieser Arbeit entstanden sind

### Originalarbeiten:

**Pellkofer H**, Schubart AS, Höftberger R, Schutze N, Pagany M, Schüller M, Lassmann H, Hohlfeld R, Voltz R, Linington C: Modelling paraneoplastic disease: onconeural antigen specific T cells mediate autoimmune encephalomyelitis in the rat (*Brain* 2004, Jun 16)

**Pellkofer H**, Höftberger R, Schubart AS, Lassmann H, Hohlfeld R, Linington C, Voltz R: Pnma1 induced paraneoplastic encephalitis in rats is CNS-specific, not dependent on gender but on the genetic background (*eingereicht*)

**Pellkofer H**, Höftberger R, Schubart AS, Lassmann H, Hohlfeld R, Linington C, Voltz R: T cells specific for the Paraneoplastic antigens PNMA1 and Yo cause encephalitis in rats affecting brain areas differentially which mimicks human disease (*in Vorbereitung*)

### Eintragung in die Genbank:

**Pellkofer HL**, Schubart A, Pagany M, Voltz R, Linington C: paraneoplastic Ma1 onconeural protein in rat complete sequence; GeneBank Accession number rPnma1 AF\_335505 and NM\_130820; 2000.

### Kongressbeiträge:

#### Vorträge:

**Pellkofer H**, Schubart AS, Höftberger R, Lassmann H, Hohlfeld R, Linington C, Voltz R: Mimicking paraneoplastic neurological disease: onconeural antigen specific T cells mediate autoimmune encephalomyelitis in the rat  
*ENS, Paris 2001*

**Pellkofer H**, Schubart AS, Höftberger R, Lassmann H, Hohlfeld R, Linington C, Voltz R: Mimicking paraneoplastic neurological disease: onconeural antigen specific T cells mediate autoimmune encephalomyelitis in the rat  
*DGN, Aachen 2001*

**Pellkofer H**, Höftberger R, Schubart AS, Lassmann H, Hohlfeld R, Linington C, Voltz R: Etablierung eines Tiermodells für paraneoplastische neurologische Erkrankungen

*AG Neuroimmunologie, Seon 2004*

**Pellkofer H**, Höftberger R, Schubart AS, Lassmann H, Hohlfeld R, Linington C, Voltz R: T cells specific for the paraneoplastic antigens PNMA1 and Yo cause encephalitis in rats affecting brain areas differentially which mimicks human disease  
*ENS, Barcelona 2004*

**Pellkofer H**, Höftberger R, Schubart AS, Lassmann H, Hohlfeld R, Linington C, Voltz R: Further characterisation of rPnma1 induced paraneoplastic encephalitis in rats  
*ENS, Barcelona 2004*

**Pellkofer H**, Höftberger R, Schubart AS, Lassmann H, Hohlfeld R, Linington C, Voltz R: Neue Aspekte des Tiermodells für paraneoplastische neurologische Erkrankungen  
*DGN, Düsseldorf 2004*

**Pellkofer H**, Höftberger R, Schubart AS, Lassmann H, Hohlfeld R, Linington C, Voltz R: Paraneoplastic neurological disorders- an animal model  
*ISNI, Venedig 2004*

**Posterbeiträge:**

**Pellkofer H**, Höftberger R, Schubart AS, Lassmann H, Hohlfeld R, Linington C, Voltz R: Tumor immune therapy targeted against onconeuroal antigens: Might this approach induce encephalomyelitis?  
*Biotherapy of Cancer, München 2003*



### 7.3 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hartmut Wekerle und Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld für die freundliche Aufnahme in die Abteilung für Neuroimmunologie am Max-Planck-Institut für Neurobiologie und die Schaffung dieser außergewöhnlich positiven, produktiven Arbeitsbedingungen.

Bei Herrn Prof. Chris Linington möchte ich mich ganz besonders für die ausgesprochen herzliche Aufnahme und Integration in seine Arbeitsgruppe, die Betreuung und die vielen konstruktiven Diskussionen bedanken. Nicht zuletzt durch sein Engagement wurde meine Begeisterung für die Forschung geweckt.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner zuverlässigen Kooperationspartnerin Frau Dr. Romana Höftberger, die die histologischen Untersuchungen durchgeführt und die entsprechenden Abbildungen erstellt hat sowie Herrn Prof. Hans Lassmann für die wertvollen, anregenden und motivierenden Diskussionen.

Danke auch an Frau Dr. Maria Pagany und Frau Sabine Kosin für ihre Kollegialität und Hilfsbereitschaft und die außergewöhnlich familiäre Arbeitsatmosphäre. Dies geschieht stellvertretend für alle anderen Mitarbeitern der Abteilung für Neuroimmunologie.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Anna Schubart für ihre fachliche und menschliche Unterstützung, die geduldige und professionelle Einführung in eine Vielzahl von Arbeitstechniken, die konstruktiven und kritischen Diskussionen und die hervorragende, außergewöhnlich engagierte Betreuung.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Raymond Voltz bedanken für seine außergewöhnliche Unterstützung und Förderung, das mir entgegengebrachte Vertrauen, seine Begeisterung für diese Arbeit und den Optimismus und die aufbauenden Worte auch in Zeiten experimenteller Rückschläge. Herzlichen Dank.

## 7.4 Lebenslauf

### **Persönliche Angaben:**

Name: Hannah Luise Pellkofer  
Geburtsdatum: 7. Februar 1976  
Geburtsort: München  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Dr. Maximilian Pellkofer,  
Eva Maria Pellkofer, geb. Resch  
Adresse: Preysingplatz 11  
81667 München  
Tel:089-48997764  
E-Mail: pellkofer@web.de

### **Schulbildung:**

1982-1986 Grundschole, Bernried  
1986-1995 Neusprachliches Gymnasium Tutzing  
1995 Abitur

### **Studium:**

11/1995-10/2002 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian  
Universität München  
9/1997 Physikum  
9/1998 1. Staatsexamen  
9/2001 2. Staatsexamen  
10/2002 3. Staatsexamen

### **Klinische Tätigkeiten:**

4/1998 Famulatur Medizinische Notaufnahme am Klinikum  
Rechts der Isar der Technischen Universität München  
3/1999 Famulatur Abteilung für Innere Medizin,  
Diakonissenkrankenhaus, Salzburg, Österreich  
3/2000 Famulatur Neurologische und Psychiatrische  
Gemeinschaftspraxis, Dr. Pellkofer / Dr. Blumenstein,  
Murnau

5/2000	Kurs der chirurgischen Ultraschalldiagnostik und der funktionellen vaskulären Sonographie, Klinikum der LMU München Großhadern
9/2000	Famulatur Thorax- und Allgemeinchirurgie, Klinikum der LMU München Großhadern
10/2001-09/2002	Praktisches Jahr
10/2001-01/2002	Medizinische Klinik III, Klinikum der LMU München Großhadern
02/2002-05/2002	Neurologische Klinik, Klinikum der LMU München Großhadern
06/2002-09/2002	Chirurgische Klinik, Klinikum der LMU München Großhadern

**Doktorarbeit:**

1999-2002	Experimentelle Arbeit am Max-Planck-Institute für Neurobiologie, Abteilung Neuroimmunologie Martinsried Direktor: Prof. H. Wekerle; Prof. R. Hohlfeld Thema: Etablierung eines Tiermodells für paraneoplastische neurologische Erkrankungen Betreuung durch Prof. Dr. Christopher Linington (PhD) und Prof. Dr. Raymond Voltz (MD)
-----------	---

**Bisherige Tätigkeiten:**

1995-2000	Pflegediensthelferin am Krankenhaus Tutzing in den Abteilungen: Chirurgie, Innere Medizin, Intensivmedizin, geriatrische Rehabilitation
2000-2001	wissenschaftliche Mitarbeiterin Max-Planck-Institut für Neurobiologie
2003-2004	AiP am Institut für klinische Neuroimmunologie in Assoziation mit der Neurologischen Klinik und Poliklinik am Klinikum der LMU München Großhadern
seit 07/2004	Assistenzärztin am Institut für klinische Neuroimmunologie in Assoziation mit der Neurologischen Klinik und Poliklinik am Klinikum der LMU München Großhadern

**Sprachkenntnisse:**

Englisch, Französisch