

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

**Ephrine und Eph-Rezeptoren in der Pathogenese der
Multiplen Sklerose und der Experimentellen
Autoimmunen Enzephalomyelitis**

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

vorgelegt von
Verena Nadine Loleit

aus

Ulm

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Edgar Meinl
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Alla Skapenko Priv. Doz. Dr. Bernd Sporer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Markus Krumbholz
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2014

**Für meine Eltern und Großeltern,
für Pad, Tanja und Julian**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Pathologie und Immunpathogenese.....	2
1.1.3 Verlaufsformen	3
1.1.4 Klinik.....	4
1.1.5 Diagnose	4
1.1.6 Therapie	4
1.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	6
1.2.1 Induktion.....	6
1.2.1.1 Aktive Induktion	6
1.2.1.2 Passive Induktion	8
1.2.2 Spontane Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	8
1.3 Ephrine und Eph-Rezeptoren	9
1.3.1 Einteilung und Struktur.....	9
1.3.2 Funktionen.....	11
1.3.2.1 Funktionen im ZNS	11
1.3.2.2 Funktionen im Immunsystem	12
1.3.2.3 Andere Funktionen	13
1.3.2.4 Ephrine und Eph-Rezeptoren bei Erkrankungen des ZNS	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Patienten und Kontrollen.....	18
2.2 Immunhistochemie	18
2.3 <i>In situ</i> -Hybridisierung	21

2.4 Zellkultur für humane Zellen inklusive Separation und Stimulation von Immunzellen	26
2.5 Microarray	29
2.6 RNA-Extraktion	30
2.7 Reverse Transkription von RNA in cDNA	31
2.8 qRT-PCR und LDA-Analysen	31
2.9 Mäuse und Genotypisierung	35
2.10 <i>Scoring</i>	36
2.11 Immunsisierung der Mäuse.....	37
2.12 Einzellzellsuspension und Zellkultur für murine Zellen	37
2.13 Proliferationsassay.....	38
2.14 ELISA.....	39
2.15 Durchflusszytometrie	42
2.16 Statistische Analyse und Software.....	43
3. Ergebnisse	44
3.1 Ephrine und Eph-Rezeptoren in der Pathogenese der MS.....	44
3.1.1 Ephrine und Eph-Rezeptoren werden in MS-Läsionen vermehrt exprimiert.....	44
3.1.2 Verschiedene Anti-Eph- und Anti-Efn-Antikörper zeigen ein unterschiedliches Färbeverhalten im ZNS gesunder Kontrollen	46
3.1.3 Humane primäre Astrozyten <i>in vitro</i> , T-Zellen und Monozyten <i>ex vivo</i> exprimieren Ephrine und Eph-Rezeptoren und zeigen ein verändertes Expressionsprofil nach der Stimulation mit verschiedenen Zytokinen.....	49
3.1.4 Ephrin-A3 und Ephrin-B3 führen nicht zu einer detektierbaren Regulation des Transkriptoms in Astrozyten <i>in vitro</i>	53
3.2 EphA4 in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis	54
3.2.1 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis in EphA4 ^{+/-} -, EphA4 ^{-/-} - und EphA4 ^{+/-} -Mäusen.....	54

3.2.2 Immunisierte und erkrankte EphA4 ^{+/+} - und EphA4 ^{-/-} - Mäuse zeigen histologisch eine typische EAE-Pathologie	56
3.2.3 CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen, B-Zellen, Dendritische Zellen und Makrophagen sind in EphA4 ^{-/-} - und EphA4 ^{+/+} - Mäusen in vergleichbarer Anzahl vorhanden	58
3.2.4 EphA4 beeinflusst die Proliferation der Immunzellen nicht	60
3.2.5 EphA4 hat keinen Einfluss auf die Sekretion von IFN γ und IL-10	63
3.2.6 Die humorale Immunantwort ist bei EphA4-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt	66
4. Diskussion.....	68
4.1 Ephrine und Eph-Rezeptoren sind in MS-Läsionen verstärkt exprimiert	68
4.2 EphA4 fördert die astrozytäre Gliose und hemmt die Regeneration im ZNS.....	70
4.3. <i>EPHB6</i> wird in MS Läsionen verstärkt exprimiert.....	71
4.4 Immunzellen exprimieren Ephrine und Eph-Rezeptoren	71
4.5 Kritische Betrachtung der Immunisierungsversuche.....	73
5. Zusammenfassung	76
6. Abkürzungen.....	79
7. Literatur	84
8. Danksagung	95
9. Lebenslauf.....	96

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Bei der Multiplen Sklerose (MS), die auch als *Encephalomyelitis disseminata* bezeichnet wird, handelt es sich um eine demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Sie ist die häufigste, nicht-unfallbedingte Ursache für eine bleibende Behinderung im jungen Erwachsenenalter. In Europa beträgt die Prävalenz 30 bis 80/100 000, die jährliche Inzidenz 3,5 bis 5/100 000 Einwohner (Hufschmidt et al. 2009). In Europa sind ungefähr 500 000, weltweit zwei Millionen Menschen an der MS erkrankt (Kobelt et al. 2006). Das weibliche Geschlecht ist dabei 1,1 bis 3,4 mal so häufig betroffen wie das männliche. Der Erkrankungsgipfel liegt um das 30. Lebensjahr. Nach einem Krankheitsverlauf von 25 Jahren sind im Durchschnitt noch ein Drittel der Patienten arbeits- und zwei Drittel gehfähig (Hufschmidt et al. 2009). 68% der deutschen Patienten erhalten eine immunmodulatorische Therapie (Flachenecker und Stuke 2008).

In der Ätiologie der MS spielen sowohl eine genetische Suszeptibilität als auch Umweltfaktoren eine Rolle. Insbesondere eine Korrelation mit verschiedenen *HLA* (Humanes Leukozytenantigen)-*DRB1* Allelen konnte bisher in mehreren Studien bestätigt werden (Jersild et al. 1973) (Ramagopalan und Ebers 2009). Bei den Genprodukten handelt es sich um Proteine, welche Bestandteile der MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-II-Moleküle sind. Diese werden vor allem auf professionell Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems exprimiert. Nicht HLA-assoziierte Marker mit geringerer Korrelation sind unter anderem *CLEC16A* (*C-type lectin domain family 16*), *IL2RA* (*Interleukin 2 receptor alpha*), *IL7RA* (*Interleukin 7 receptor alpha*), *CD* (*Cluster of Differentiation*) *58* (Hafler et al. 2007) (Hoppenbrouwers et al. 2009), *TNFRSF1A* (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A*), *IRF8* (*Interferon regulatory factor 8*) und *CD6* (de Jager et al. 2009). Die Hypothese, dass bei der MS, eine erbliche Komponente eine Rolle spielt konnte durch signifikant unterschiedliche Konkordanzraten zwischen ein- und zweieiigen Zwillingen belegt werden. Während jene Rate für das Auftreten der MS bei einem monozygoten Paar 30 Prozent beträgt, beläuft sie sich bei dizygoten Zwillingen auf nur 5 Prozent (Sadovnick et al. 1993).

Diverse Erreger stehen als auslösende Umweltfaktoren der MS in der Diskussion, wobei diese kritischen Überprüfungen meist nicht stand halten konnten. Besonders hartnäckig hält sich seit nunmehr über 25 Jahren die Diskussion um eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass das relative Risiko an der MS zu erkranken nach durchgemachter infektiöser Mononukleose signifikant erhöht ist (Thacker et al. 2006; Levin et al. 2010). Laut aktuellen Studien erhöht ein Vitamin D Mangel im Serum das Risiko an der MS zu erkranken (Munger et al. 2006). Hierbei spielen insbesondere durch Vitamin D vermittelte immunmodulatorische Effekte eine Rolle (Correale et al. 2009).

1.1.2 Pathologie und Immunpathogenese

Autoreaktive myelinspezifische T-Zellen finden sich sowohl im Blut gesunder Individuen als auch bei MS-Patienten (Pette et al. 1990). Während beim Gesunden eine Aktivierung dieser durch immunregulatorische Mechanismen verhindert wird, kommt es bei MS-Patienten aus bisher unbekannter Ursache zur Aktivierung. Diskutiert wird eine autoimmune Pathogenese, getriggert zum Beispiel durch molekulares Mimikry (Oldstone 1987; Getts und Miller 2010) oder durch ein Ungleichgewicht im Rahmen regulatorischer immunologischer Mechanismen (Viglietta et al. 2004). Eine chronische Entzündung des ZNS als Reaktion auf ein infektiöses Agens oder Veränderungen im Rahmen eines degenerativen ZNS-Prozesses konnten bisher nicht ausgeschlossen werden (Sladkova et al. 2011). Chemokin-vermittelt können die aktivierten Immunzellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und gelangen so ins ZNS. Im Zusammenspiel mit Monozyten/Makrophagen und ZNS-ständiger Mikroglia kommt es zur Entwicklung einer Läsion (Plaque) und in der Folge zur Demyelinisierung und einem axonalen Schaden (Bjartmar et al. 1999). Im Verlauf können Oligodendrozyten proliferieren und tragen damit zu einer - meist inkompletten - Remyelinisierung bei. Die Proliferation astrozytärer Zellen führt zur Ausbildung einer glialen Narbe (Holley et al. 2003; Noseworthy et al. 2000; Hemmer et al. 2006). Zusammenfassend ist die bisher angenommene Hypothese der Immunpathogenese der MS in Abbildung 1 dargestellt.

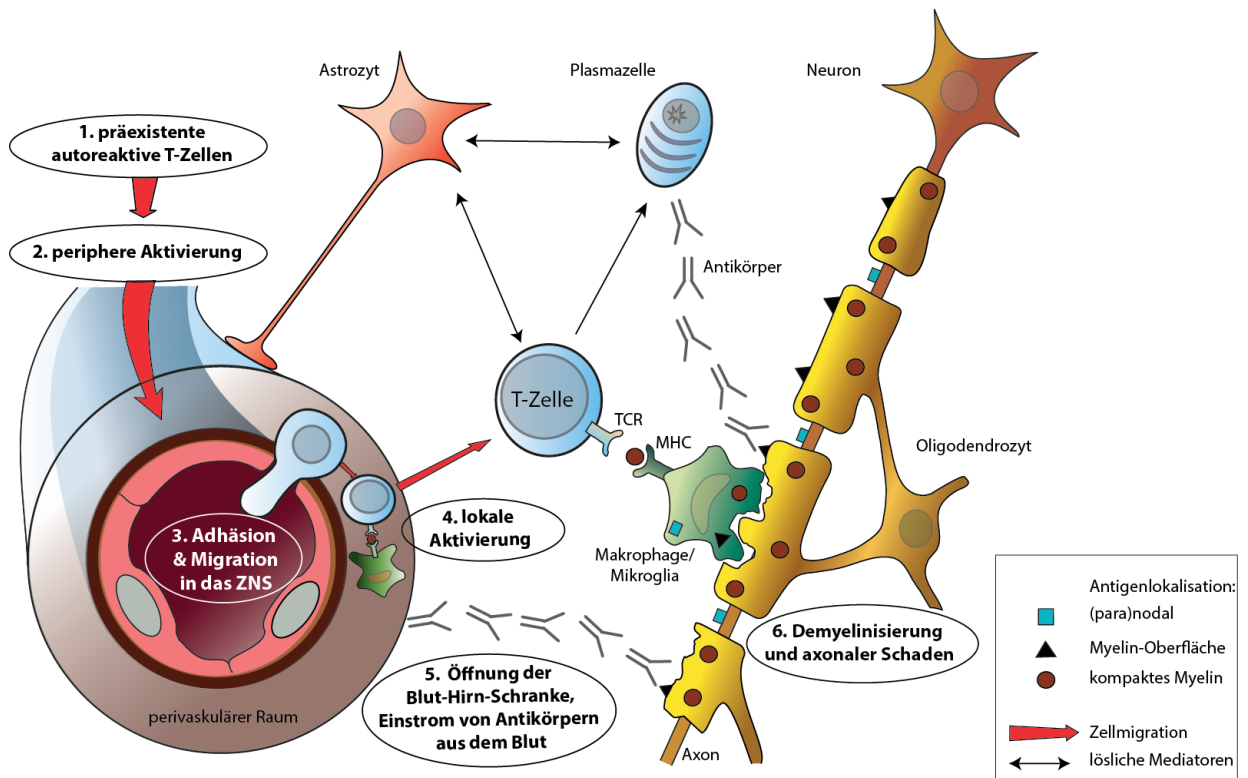


Abb. 1: Konzept zur Immunpathogenese der MS, nach Krumbholz und Meinl aus Schmidt und Hoffmann, Multiple Sklerose, 2012. Immunzellen werden in peripheren Organen durch einen unbekanntem Mechanismus aktiviert und können Chemokin- und Zytokin-vermittelt die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Im ZNS führen diese im Zusammenspiel mit ZNS-ständigen Immunzellen zu Entzündung, Demyelinisierung und einem axonalen Schaden.

Bei den an der Pathogenese beteiligten Immunzellen handelt es sich überwiegend um $CD4^+$ - sowie $CD8^+$ -T-Zellen und B-Zellen (Berer et al. 2011; Fletcher et al. 2010) im Zusammenspiel mit Monozyten/Makrophagen, Dendritischen Zellen und ZNS-ständiger Mikroglia. Ebenso spielen humorale Faktoren wie Zytokine, Chemokine, Komplementfaktoren und lösliche Immunglobuline eine Rolle (Hemmer et al. 2006).

1.1.3 Verlaufsformen

Bei der MS unterscheidet man vier Verlaufsformen: schubförmig-remittierend, schubförmig-progredient, sekundär chronisch progredient und primär chronisch progredient. Ein Schub ist definiert als das Vorliegen von objektiven oder subjektiven Symptomen, welche mindestens 24 Stunden andauern. Zwischen einem ersten und einem zweiten Schub müssen hierbei *per definitionem* mindestens 30 Tage liegen, damit der zweite Schub auch tatsächlich als ein solcher bezeichnet werden kann. Mit einem Anteil von 80-85% ist der schubförmig-remittierende Verlauf der häufigste.

Zwischen den Schüben kommt es dabei zu einer Remission, wobei eine Restsymptomatik bestehen bleiben kann. In weniger als 5% der Fälle liegt eine schubförmig-progrediente MS vor. Die Erkrankung verläuft hier progredient mit eindeutigen Schüben. In 10 bis 15% der Fälle liegt bei Erkrankungsbeginn ein primär chronisch progredienter Verlauf vor. Diese Verlaufsform zeichnet sich durch eine stetige Verschlechterung der Symptomatik ohne das Vorliegen einzelner Schübe aus. Übergänge zwischen den verschiedenen Formen sind möglich (Hufschmidt et al. 2009).

1.1.4 Klinik

Typischerweise manifestiert sich die MS zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Die Symptome der Patienten sind vom Ort der Schädigung im ZNS abhängig. Bei einem Befall des N. opticus kommt es zur Visuseinschränkung beziehungsweise –verlust. Spastische Mono-, Hemi- und Paraparesen sowie Blasen- und Mastdarmstörungen treten unter anderem bei einer Affektion des Rückenmarks auf. Läsionen im Hirnstamm führen zu Schwindel und Augenmuskelparesen mit Doppelbildern. Eine zerebelläre Affektion äußert sich in einer Stand-, Gang- und Zeigeataxie, Nystagmus, Intentionstremor und Dysarthrie (Hufschmidt et al. 2009).

1.1.5 Diagnose

Die Diagnose der MS stützt sich auf die revidierten McDonald Kriterien. Bei Nachweis einer räumlichen und zeitlichen Dissemination, basierend auf klinischen und paraklinischen Befunden, ohne Hinweis auf das Vorliegen einer anderen wahrscheinlicheren Ätiologie kann die Diagnose gestellt werden. Die paraklinischen Befunde beinhalten die Einbeziehung von Kernspintomographie (MRT), Liquordiagnostik und Elektrophysiologie (McDonald et al. 2001; Polman et al. 2011).

1.1.6 Therapie

In der Therapie der MS unterscheidet man die Schubtherapie, die Schubprophylaxe sowie die symptomatische Therapie (Hufschmidt et al. 2009).

Die Therapie des akuten Schubs erfolgt mit einer Cortison-Hochdosistherapie über drei bis fünf Tage. Bei schweren Schüben ohne Rückbildungstendenz innerhalb von 14 Tagen, kann diese wiederholt werden. Alternativ ist die Durchführung einer Plasmapherese möglich (Hufschmidt et al. 2009).

Die Schubprophylaxe erfolgt mit immunmodulatorischen Substanzen wie β -Interferonen (Avonex, Betainterferon, Rebif) (Johnson 1990; Cohen und Rivera 2010). Laut aktuellen Studien ist der Einsatz des Peptidgemischs Glatirameracetat (Copaxone) eine weitere Möglichkeit (Arnon 1996) und gleichwertig zur Interferon- β Therapie (Khan et al. 2001; Wiendl et al. 2008). Im Rahmen der sogenannten Eskalationstherapie können der monoklonale Antikörper Natalizumab (Tysabri®) oder alternativ der oral applizierbare Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Modulator Fingolimod (FTY-720, Gilenya®) eingesetzt werden. Eine weitere Alternative bei schweren Schüben und rascher Erkrankungsprogredienz ist Mitoxantron (Hufschmidt et al. 2009) .

Immunglobulin G, Azathioprin und Cyclophosphamid werden dagegegen weitaus seltener in der Therapie der MS eingesetzt (Wiendl et al. 2008; Hufschmidt et al. 2009). Neue Therapieansätze stützen sich auf oral applizierbare Immunmodulatoren wie das Purin-Analogon Cladribin, Laquinimod und Fumarsäure (Hufschmidt et al. 2009). Zudem spielen monoklonale Antikörper wie Rituximab (anti-CD20) (Barun und Bar-Or 2011; Hauser et al. 2008), Alemtuzumab (anti-CD52) oder Daclizumab (anti-CD25) eine zunehmende Rolle (Hufschmidt et al. 2009). Die Therapie der MS ist zusammenfassend in Abbildung 2 dargestellt.

Indikation	CIS ¹	RRMS ¹		SPMS ¹	
		1. Wahl	2. Wahl	mit aufgesetzten Schüben	ohne aufgesetzte Schübe
Eskalations-therapie			– Fingolimod ⁴ – Natalizumab ⁴	– Mitoxantron (– Cyclophosphamid) ⁵	
Basistherapie	– Glatirameracetat – Interferon-β 1a i.m. – Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c.	– Glatirameracetat – Interferon-β 1a i.m. – Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c. (– Azathioprin) ² (– IVg) ³			– Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c. – Mitoxantron (– Cyclophosphamid) ⁵
Schub-therapie	2. Wahl – Plasmaseparation				
	1. Wahl – Methylprednisolonpuls				

¹ = Substanzen in alphabetischer Reihenfolge. Die hier gewählte Darstellung impliziert KEINE Überlegenheit einer Substanz gegenüber einer anderen innerhalb einer Indikationsgruppe (dargestellt innerhalb eines Kastens).
² = Zugelassen, wenn IFN-β nicht möglich ist oder unter Azathioprin-Therapie ein stabiler Verlauf erreicht wird.
³ = Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen.
⁴ = Fingolimod und Natalizumab haben neben der Zulassung zur Eskalationstherapie auch eine Zulassung zur Behandlung Therapie-naiver Patienten bei mindestens 2 behindernden Schüben mit Krankheitsprogression binnen der letzten 12 Monate und mindestens einer Gd+-Läsion bzw. einer signifikanten Zunahme der T2-Läsionen in der MRT.
⁵ = Zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunkrankheiten, somit lediglich nur für fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen, idealerweise nur an ausgewiesenen MS-Zentren.

Abb. 2: Therapie der MS, modifiziert nach der aktuellen DGN (Deutsche Gesellschaft für Neurologie)-Leitlinie. Man unterscheidet die Schubtherapie sowie die Schubprophylaxe, die je nach Krankheitsaktivität als Basis- oder Eskalationstherapie durchgeführt wird.

Schubtherapie und –prophylaxe werden durch eine symptomatische, individuelle Therapie ergänzt (Hufschmidt et al. 2009).

1.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

1.2.1 Induktion

1.2.1.1 Aktive Induktion

Das in der MS Forschung gebräuchliche Tiermodell bezeichnet man als EAE. EAE steht dabei für „Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis“. Diese kann in verschiedenen Tierspezies und auf verschiedenen Wegen induziert werden (Krishnamoorthy und Wekerle 2009; Croxford et al. 2011).

Es bestehen aktuell zwei Möglichkeiten, eine EAE zu induzieren (Krishnamoorthy und Wekerle 2009): die aktive und passive Induktion. Davon abzugrenzen ist die spontane EAE.

Die Anfänge der aktiven Induktion der EAE reichen bis in das Jahr 1942 zurück. Rivers et al. immunisierten Affen mit ZNS-Homogenisaten von Kaninchen und beobachteten in der Folge Lähmungen der Tiere in Kombination mit einem

perivaskulären Infiltrat und Demyelinisierung im ZNS (Rivers et al. 1933). Heutzutage erfolgt die aktive Immunsierung mittels ZNS-Homogenisaten oder speziellen Antigenen (siehe unten). Einige der applizierten Antigene sind bei einigen Tieren pathogen und führen zur Entwicklung einer EAE während dasselbe Autoantigen bereits bei anderen Stämmen derselben Spezies wie auch in anderen Tierspezies keinen Effekt hat. Die Liste bisher identifizierter potentieller Autoantigene, die in der Pathogenese der EAE und fraglich in der MS eine Rolle spielen, beinhaltet Myelin-Antigene {Basisches Myelinprotein (MBP), Myelinisches Proteolipidprotein (PLP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), Basisches Myelin assoziiertes Oligodendrozyten-Protein (MOBP), Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), Oligodendrozyten-spezifisches Protein (OSP), Nerven wachstumshemmender Faktor A (Nogo-A), 2', 3'-cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNPase)}, gliale Antigene {Saures Gliafaserprotein (GFAP), S100 β , α - β -Crystallin} und neuronale Antigene (Neurofilament-L, -M, β -Synuclein, Contactin-2, Neurofascin) (Krishnamoorthy und Wekerle 2009; Derfuss et al. 2009; Mathey et al. 2007).

Bei der aktiven Induktion wird das entsprechende Antigen als Gesamtprotein oder als kleines Peptid in meist komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) (zur Stimulation des Immunsystems) injiziert (Wekerle et al. 1994). In der Mehrzahl der Fälle erfolgt anschließend – ebenfalls zur Stimulation des Immunsystems - eine intraperitoneale Injektion mit Pertussistoxin (Munoz et al. 1984).

Während in den Anfängen der EAE vor allem Meerschweinchen und Affen Verwendung fanden, wurden im Verlauf zunehmend Ratten- und Mausmodelle entwickelt. Am häufigsten werden heutzutage Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 verwendet. Zunehmend haben sich aber auch Mäuse mit dem genetischen Hintergrund SJL/J als sehr hilfreich im Bereich der MS Erforschung erwiesen, da die Induktion - zum Beispiel mit MOG oder PLP - hier zu einem schubförmig-remittierenden Verlauf der EAE führt. Dieser Verlauf ähnelt sehr dem häufigsten Verlauf der MS beim Menschen und ist daher von besonderem Interesse (Krishnamoorthy und Wekerle 2009).

1.2.1.2 Passive Induktion

Die passive Induktion der EAE wird auch als Transfer-EAE bezeichnet. Wie der Name bereits suggeriert werden dabei pathogene Bestandteile – Immunzellen im Allgemeinen beziehungsweise T-Zellen im Speziellen - in ein Versuchstier transferiert. Erstmals gelang dies 1960 durch den Transfer von Immunzellen durch Paterson et al. (Paterson 1960). Einen Meilenstein in der Geschichte der EAE begründeten Ben-Nun et al. als diese erstmalig aus einem mit MBP immunisierten und erkrankten Tier, autoreaktive CD4⁺-Zellen, die einen spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) auf ihrer Oberfläche trugen, gewinnen konnten und diese in ein bis dato gesundes Tier transferierten, welches daraufhin erkrankte (Ben-Nun et al. 1981).

Heute werden den Versuchstieren bei der passiven Induktion der EAE vor allem *in vitro* aktivierte autoimmune T-Helferzellen, vor allem Th₁-Zellen, injiziert.

1.2.2 Spontane Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Bei diesen Modellen werden genetisch manipulierte Mäuse eingesetzt.. Diese Mäuse sind in der Regel Träger eines *knock-ins* oder eines *knock-outs* eines pathogenetisch relevanten Gens, zum Beispiel eines transgenen T-Zell-Rezeptors, genetisch manipulierter MHC-Moleküle, Zytokine oder neurotropher Faktoren, welche in der Mehrzahl der Tiere zum spontanen Auftreten einer EAE führen (Krishnamoorthy und Wekerle 2009) (Mix et al. 2010). Die transgenen T-Zell-Rezeptoren können dabei zum Beispiel für MBP, MOG oder auch PLP spezifisch sein. In Abhängigkeit vom Hintergrund der Tiere und Spezifität des T-Zell-Rezeptors entwickeln 4-80% der Tiere eine spontane EAE. In letzter Zeit wurden zudem sogenannte „humanisierte transgene Mäuse“ entwickelt (Fugger 2000). Diese Tiere tragen einen autoreaktiven MBP-spezifischen T-Zellrezeptor, welcher aus humanen CD4⁺-T-Zellklonen stammt.

In manchen EAE-Modellen spielen nicht nur T-Zellen, sondern auch B-Zellen eine Rolle. So gibt es eine Anti-MOG T-Zell-Rezeptor/Ig-transgene Maus, die sogenannte *Devic-Maus*. Diese Mäuse tragen einen transgenen MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor (Krishnamoorthy et al. 2006) sowie eine transgene schwere Kette eines MOG-spezifischen monoklonalen Antikörpers (Litzenburger et al. 2000; Litzenburger et al. 1998). 50% der Tiere entwickeln inflammatorische, demyelinisierende Läsionen

im Rückenmark sowie im Bereich des Sehnervs. Diese Form der EAE erinnert damit stark an die Neuromyelitis optica (Krishnamoorthy et al. 2007).

Bisher wurden nur EAE Verläufe beschrieben, die am ehesten einem akuten MS-Schub beziehungsweise der Neuromyelitis optica ähneln. Da aber die Mehrzahl der MS Patienten an einem schubförmig-remittierenden Verlauf der MS erkrankt ist, ist insbesondere ein Tiermodell, welches eben genau diesen widerspiegelt von zunehmendem Interesse; transgene SJL/J-Mäuse, die einen für MOG spezifischen T-Zell-Rezeptor tragen, entwickeln zu einem hohen Prozentsatz spontan eine schubförmig-remittierend verlaufende EAE. Während sich hier die Erstmanifestation, also der erste Schub, typischerweise in einer ausgeprägten Ataxie manifestiert, sind die weiteren Schübe meist durch klassische EAE-Symptome gekennzeichnet (Pöllinger et al. 2009a).

Insgesamt eignet sich das Modell der EAE besonders um die Effekte von Medikamenten im Rahmen einer autoimmunen Entzündung genauer zu analysieren. Des Weiteren erlaubt die aktive wie auch die passive EAE Induktion in *knockout*- und *knockin*- sowie in transgenen Tieren genauso wie die spontanen EAE-Modelle unter zur Hilfe nahmer genetisch manipulierter Tiere die Funktionsanalyse diverser Gene im Rahmen der EAE (Krishnamoorthy und Wekerle 2009).

1.3 Ephrine und Eph-Rezeptoren

1.3.1 Einteilung und Struktur

Eph-Rezeptoren (Eph) repräsentieren die größte Familie von Rezeptortyrosinkinasen. Sie werden in zwei Untergruppen eingeteilt. Eine A-Gruppe, welche die Rezeptoren EphA1 bis A8 enthält und eine B-Gruppe mit EphB1 bis EphB4 und EphB6. Die Expression von EphB5 ist bisher nur im Hühnchen bekannt und konnte weder im Menschen noch in der Maus nachgewiesen werden. Die Liganden sind die sogenannten Ephrine (Efn). Auch sie werden in zwei Untergruppen, A und B, unterteilt. Die A-Gruppe enthält die Ephrine A1 bis A5. Die Ephrine dieser Gruppe sind mit der Zellmembran über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) verbunden. Die B-Untergruppe enthält die

Ephrine B1 bis B3. Diese Moleküle enthalten eine Transmembrandomäne (Gay et al. 1997).

Eph-Rezeptoren der A-Gruppe binden typischerweise Ephrine der Gruppe A, und Eph-Rezeptoren der B-Gruppe B-Ephrine. Eine Ausnahme stellt der EphA4-Rezeptor da; er kann sowohl A-Ephrine als auch die meisten B-Ephrine binden (Kullander und Klein 2002) .

In Abbildung 3 ist der Aufbau von Ephrinen und Eph-Rezeptoren schematisch dargestellt.

Da sowohl die Liganden als auch die Rezeptoren membrangebunden vorliegen, sind für gegenseitige Bindung und damit auch für die Aktivierung der entsprechenden Signalwege, Interaktionen zwischen den entsprechenden Zellen notwendig (Goldshmit et al. 2006b). Dabei kann das Signal entweder in die Zelle übersetzt werden, die den Rezeptor trägt – *Forward Signaling* - oder in jene, die den Liganden trägt – *Reverse Signaling* (Pugliatti et al. 2006; Kullander und Klein 2002).

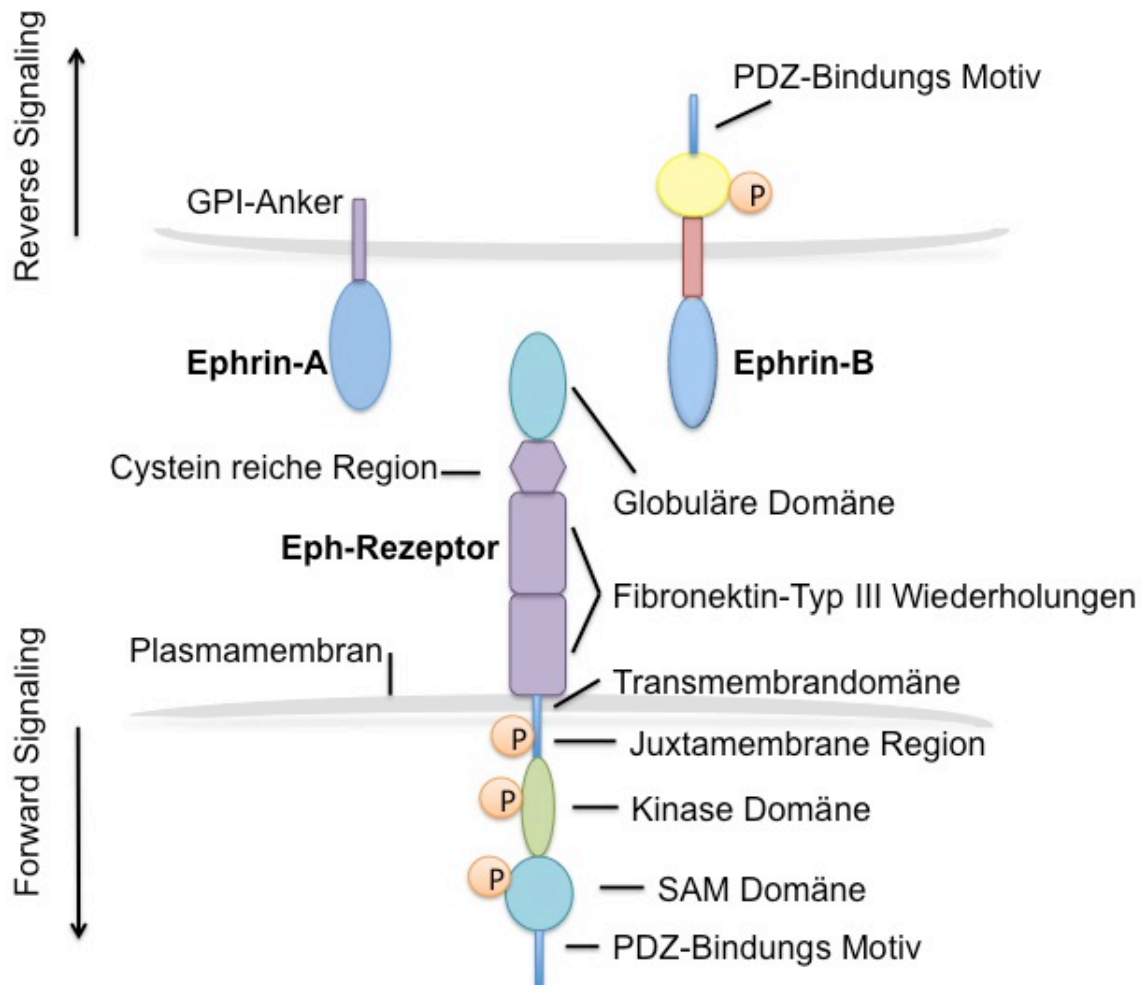


Abb. 3: Aufbau von Ephrinen und Eph-Rezeptoren, modifiziert nach (Kullander und Klein 2002). P: phosphoryliert.

Wird das Signal in die Zelle übertragen, die den Rezeptor trägt, so spricht man vom *Forward Signaling*. Beim *Reverse Signaling* wird das Signal in die den Liganden tragende Zelle übersetzt.

1.3.2 Funktionen

1.3.2.1 Funktionen im ZNS

Das Ephrin/Eph-System wird ubiquitär exprimiert und hat sehr viele Funktionen, von denen einige noch nahezu unerforscht sind.

Das Ephrin/Eph-System spielt sowohl im sich entwickelnden als auch im reifen, im gesunden sowie im erkrankten ZNS eine große Rolle (Goldshmit et al. 2006b; Pasquale 2008).

In der Entwicklung des ZNS sprossen Axone aus, um anhand vorgegebener Migrationswege zu ihren Zielzellen zu gelangen. Diverse Signalmoleküle sorgen dafür, dass dabei die richtigen Wege beschriftet werden. In diesem Zusammenhang spielen auch Ephrine und deren Rezeptoren eine ausschlaggebende Rolle. Zwischen den Rezeptoren und den Liganden kommen hierbei abstoßende Kräfte zum Tragen (Goldshmit et al. 2006b), zum Beispiel in der Entwicklung des Kortikospinaltraktes (Wang und Anderson 1997), der anterioren Kommissur (Orioli et al. 1996) und bei der Migration von Zellen, welche der Neuralleiste entstammen (Wang und Anderson 1997). In der Entwicklung des visuellen Systems, eines Bestandteils des ZNS, spielt vor allem die Ausbildung sogenannter topographischer Karten eine Rolle, das heißt, dass das Gesichtsfeld in einer ganz bestimmten Ordnung und Systematik in allen Bereichen des visuellen Systems abgebildet wird (Goldshmit et al. 2006b). Man nimmt an, dass hierbei Kräfte zwischen EphA-Rezeptoren, welche in der Retina exprimiert werden, und Ephrinen der Gruppe A, welche im Coliculus superior exprimiert werden, zum Tragen kommen (Kullander und Klein 2002).

Aber auch im adulten ZNS werden Eph-Rezeptoren und Ephrine exprimiert, meist jedoch auf einem niedrigeren Expressionsniveau. Man findet sie auf verschiedenen Zelltypen, so zum Beispiel auf Astrozyten und Neuronen und in diversen ZNS-Regionen (Goldshmit et al. 2006b). Das Ephrin/Eph-System ist hier wichtig bei der Erhaltung und Bildung neuronaler Schaltkreise und Synapsen (Olivieri und Miescher 1999; Murai und Pasquale 2002; Takasu et al. 2002). Dabei werden Mechanismen wie Lernen und Gedächtnis wesentlich beeinflusst (Yamaguchi und Pasquale 2004; Grunwald et al. 2004). Hierbei spielt vor allem die Bahnung von Langzeit-Potenzierung (LTP, *long-term potentiation*), aber auch von Langzeit-Depression (LTD, *long-term depression*), an N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren, und damit die Entwicklung von neuronalen Schaltkreisen, welche wesentlich zur Gedächtnisbildung beitragen, eine wichtige Rolle (Grunwald et al. 2001).

1.3.2.2 Funktionen im Immunsystem

Multiple Rezeptoren und auch Liganden des Ephrin/Eph-Systems werden in lymphatischen Organen sowie in Immunzellen, vorrangig in Lymphozyten, exprimiert (Wu und Luo 2005). Komponenten des Ephrin/Eph-Systems spielen dabei vor allem bei immunologischen Mechanismen, welche einen Zell-Zell-Kontakt erfordern, eine

Rolle; so zum Beispiel in der Entwicklung von Thymozyten in reife T-Zellen und auch bei der Differenzierung in aktivierte T-Zellen (Pasquale 2008). Darüber hinaus modulieren Eph-Rezeptoren auch das Ausmaß einer T-Zell-Rezeptor-Aktivierung im Sinne kostimulatorischer Rezeptoren. Hierbei spielt vor allem EphB6 eine herausragende Rolle (Wu und Luo 2005). Eine Aktivierung der EphB-Rezeptoren verstärkt nicht nur die Proliferation von T-Zellen, sondern fördert auch die vermehrte Produktion von $\text{IFN}\gamma$ sowie die Aktivierung zytotoxischer CD8^+ -T-Zellen. Entsprechend zeigen EphB6-negative T-Zellen – trotz normaler T-Zellzahlen – ein eingeschränktes *Signaling* über T-Zell-Rezeptoren, eine verminderte Proliferation und Sekretion von Zytokinen *in vitro*. EphB6 *knockout* Mäuse zeigen – obwohl sie normale T-Zellzahlen aufweisen – eine eingeschränkte zelluläre Immunantwort (Luo et al. 2004).

EphB-Rezeptoren sind zudem wichtig für die positive Selektion im Thymus und die T-Zell-Antwort im Zusammenspiel mit Dendritischen Zellen. Physiologischerweise werden die EphB-Rezeptoren auf T-Zellen vor allem durch den Kontakt mit Ephrin-B-tragenden T-Zellen, epithelialen Zellen im Thymus oder Dendritischen Zellen aktiviert. Auch EphA-Rezeptoren sowie Ephrine, die der Gruppe A angehören, werden von Thymozyten sowie von T-Zellen exprimiert (Freywald et al. 2006; Wu und Luo 2005).

Eph-Rezeptoren und deren Liganden werden von B-Zellen exprimiert (Nakanishi et al. 2007; Aasheim et al. 2000), wobei deren Funktion in diesem System noch weitgehend unbekannt ist.

1.3.2.3 Andere Funktionen

Das Ephrin/Eph-System hat auch außerhalb von ZNS und Immunsystem eine Vielzahl von Funktionen.

β -Zellen des Pankreas exprimieren sowohl EphA-Rezeptoren als auch deren Liganden. Während das EphA-*Forward-Signaling* die Insulinsekretion hemmt, wird diese wiederum durch das Ephrin-A-*Reverse-Signaling* gefördert. Auch EphB-Rezeptoren und Ephrin-Bs werden von den β -Zellen des Pankreas exprimiert. Deren Funktion ist in diesem Organ aber noch weitgehend unbekannt (Pasquale 2008).

Dies ist natürlich auch im Hinblick auf die Volkskrankheit Diabetes mellitus 2 sehr interessant.

Sowohl für die Entwicklung des knöchernen Skeletts als auch für die Knochenhomeostase ist das Ephrin/Eph-System von großer Bedeutung. Kommt es in der Entwicklung zu Dysfunktionen des EphB/Ephrin-B-*Signalings*, so führt dies zur Malformationen des knöchernen Skeletts. Auch beim Erwachsenen kommunizieren Osteoblasten und Osteoklasten über das EphB/Ephrin-B-System (Pasquale 2008) und tragen so eventuell bei einer Fehlregulation auch zur Entstehung der Osteoporose bei.

Auch bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Homeostase ist dieses System von großer Bedeutung, insbesondere bei der Differenzierung von Stammzellen in den basalen Krypten, welche vor allem EphB-Rezeptoren exprimieren, zu epithelialen Zellen des Darmlumens, welche überwiegend Ephrin-Bs exprimieren (Pasquale 2008).

Nicht nur gesundes Gewebe, sondern auch nahezu alle Tumorentitäten exprimieren Eph-Rezeptoren und Ephrine, meist sogar in größerer Anzahl. Die Genexpression wird dabei vermutlich durch onkogene Signalwege, Hypoxie und inflammatorische Zytokine reguliert. Bei einigen Tumoren können sie dabei die Funktion von Tumorsuppressorgenen, bei anderen wiederum jene von Protoonkogenen haben. Zudem exprimieren oftmals auch Tumorstromazellen Eph-Rezeptoren und Ephrine und tragen damit zum Mikromilieu bei. Darüber hinaus findet man die Rezeptortyrosinkinasen auch in den den Tumor versorgenden Gefäßzellen, wo sie zur Tumorangiogenese und damit zu Tumorwachstum und –metastasierung beitragen. In neuester Zeit geht man davon aus, dass die Eph-Rezeptoren und Ephrine bereits in sogenannten Nischenzellen, welche das notwendige Milieu für Stammzellen bilden, und in Stammzellen selbst exprimiert werden und somit von Grund auf an der Karzinogenese beteiligt sind (Pasquale 2008).

1.3.2.4 Ephrine und Eph-Rezeptoren bei Erkrankungen des ZNS

Kommt es zu einem Schaden des ZNS, so werden Eph-Rezeptoren an der Oberfläche vieler Zellen des ZNS vermehrt exprimiert. Ein Prozess, der durch proinflammatorische Zytokine vermittelt wird (Goldshmit et al. 2006b).

Die Ausbildung der glialen Narbe durch reaktive Astrozyten stellt dabei den zentralen Prozess dar. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach einer Schädigung des ZNS kommt es zu morphologischen und funktionellen Veränderungen der Astrozyten, die nun vermehrt GFAP exprimieren (Goldshmit et al. 2006b). Einerseits unterstützen diese Prozesse die Rekonstruktion des zerstörten Areals, die Neuorganisation von Blutgefäßen sowie die Einwanderung epithelialer Zellen (Faulkner et al. 2004), andererseits behindern sie auch die neuronale Regeneration in einem erheblichen Maß (Goldshmit et al. 2004). Die Ephrin/Eph-Expression ist an der Ausbildung dieser glialen Narbe und damit an der Hemmung neuronaler Regeneration wesentlich beteiligt (Goldshmit et al. 2006).

Die Regulation von Ephrinen und deren Rezeptoren im Rahmen einer Verletzung und bei Erkrankungen des ZNS ist zusammenfassend in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab. 1: Regulation von Ephrinen und Eph-Rezeptoren im Rahmen einer Schädigung beziehungsweise einer Erkrankung des ZNS (MS ausgenommen), modifiziert nach (Goldshmit et al. 2006).

Eph/Efn	Verletzung des Rückenmarks	Verletzung des Gehirns	ZNS-Erkrankung
EphA1			↓ Glioblastom
EphA2		↑ Subduralhämatom: Kortex	
EphA3	↑ Astrozyten, Oligodendrozyten, Axone, Intermediärzellen, Motoneurone	↑ Subduralhämatom: Kortex ↑ Hippocampale Neurone	
EphA4	↑ Astrozyten, Oligodendrozyten, Motoneurone	↑ Hippocampale Neurone	↑ Alzheimer: cholinerge Neurone
EphA5	↑ Astrozyten	↑ Hippocampale Neurone	
EphA6	↑ Astrozyten, Oligodendrozyten, Axone, Intermediärzellen, Motoneurone	↑ Hippocampale Neurone	

EphA7	↑Astrozyten, Oligodendrozyten, Motoneurone		
EphA8	↑Astrozyten, Oligodendrozyten, Axone, Motoneurone		↓Glioblastom
Efn-A1-5		↑Hippocampus	
EphB1		↑Subduralhämatom: Kortex	
EphB2	↑Meningeale Fibroblasten	↑Hippocampale Neurone	
EphB3	↑Astrozyten, Axone	↑Subduralhämatom: Kortex	
EfnB1		↑Hippocampus, Astrozyten	
EfnB2	↑Astrozyten		

↑: vermehrte Expression, ↓: verminderte Expression.

Bisher gibt es nur eine einzige Publikation, welche sich mit Ephrinen und Eph-Rezeptoren in Zusammenhang mit der MS beschäftigt: von Sobel wurde auf der Grundlage immunhistochemischer Daten berichtet, dass EPHA1, EPHA3, EPHA7, EFNA1 und EFNA3 auf reaktiven Astrozyten beziehungsweise auf Astrozyten in aktiven MS Läsionen, EPHA3, EPHA7, EFNA1 und EFNA2 auf Axonen in aktiven MS Läsionen, EFNA1-A3 auf kortikalen Neuronen von MS Patienten jeweils im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermehrt exprimiert werden (Sobel 2005). Quantitative Daten zur Expression von Eph-Rezeptoren und Ephrinen in MS Läsionen liegen bisher nicht vor.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine mögliche Rolle des Ephrin/Eph-Systems im ZNS von MS Patienten zu untersuchen.

Zunächst wurde die Expression aller Ephrine und Eph-Rezeptoren in verschiedenen Typen von MS Läsionen (aktive, chronisch re- und demyelinisierte Läsionen) mit der PCR quantifiziert. Anschließend sollten die dysregulierten Ephrine und Eph-Rezeptoren verschiedenen Zelltypen in der MS Läsion zugeordnet werden. Hierzu wurden Immunhistochemie, *in situ*-Hybridisierung und die Untersuchung kultivierter humaner Astrozyten eingesetzt. Einige Eph-Rezeptoren und Ephrine werden in Astrozyten gefunden. Eine Regulation der Expression und mögliche Funktion von Ephrin-A3, -B3, Eph-A2, -A4, -A7 und -B6 wurde *in vitro* an humanen Astrozyten untersucht. Da EphA4 in MS Läsionen besonders stark induziert gefunden wurde, wurde in einem EAE Modell die Rolle von EphA4 bei autoimmuner ZNS Inflammation durch den Einsatz von EphA4 defizienten Mäusen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Kontrollen

Es standen 46 Gewebelöcke zur Verfügung, wovon 25 von MS-Patienten und sechs von Kontrollen ohne Anhalt für eine neurologische Erkrankung stammten. 27 der Proben lagen als Kryoblöcke vor. Bei den restlichen 19 Blöcken handelte es sich um Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe. Das Autopsiematerial stammte von der *UK MS Brain Bank*, der *Neuro Resource Tissue Bank* des UCL Instituts für Neurologie in London, dem Zentrum für Hirnforschung in Wien und dem *Netherlands Institute of Neuroscience* in Amsterdam. Eine Einverständniserklärung für die Entnahme von Autopsiematerial hatten alle Patienten und Kontrollen vor ihrem Tod abgegeben. Die Experimente erfolgten mit dem Einverständnis der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Die MS-Läsionen wurden in aktive und chronisch inaktive Läsionen eingeteilt (Mohan et al. 2010).

2.2 Immunhistochemie

Materialien und Geräte

Kaninchen(rb)-Serum	DAKO, Hamburg
Ziegen (gt)-Serum	Sigma, München
Anti-CD68	DAKO, Hamburg
Maus (ms)-anti-EFNA3	R&D Systems, Cambridge, UK, Bestellnummer: MAB359, Lotnummer: DAS01
Kaninchen (rb)-anti-EFNA3	Zymed/Invitrogen, Darmstadt, Bestellnummer: 36-7500, Lotnummer: 1370042
Rb-anti-EFNB3	Abcam, Abingdon, UK, Bestellnummer: ab53063
Gt-anti-EFNB3	R&D Systems, Cambridge, UK, Bestellnummer: AF395, Lotnummer: CEQ05

Rb-anti-EPHA4	Abcam, Abingdon, UK, Bestellnummer: ab5389
Ms-anti-EPHA4	Zymed/Invitrogen, Darmstadt, Bestellnummer: 37-1600, Lotnummer: 267915
Rb-anti-EPHA7	Abcam, Abingdon, UK, Bestellnummer: ab5400
Ms-anti-EPHA7, IgM	Abcam, Abingdon, UK, Bestellnummer: ab54640
Rb-anti-EPHB6	Abcam, Abingdon, UK, Bestellnummer: ab60164
Ms-anti-EPHB6	Abcam, Abingdon, UK, Bestellnummer: ab54656
Gt-anti-rb, biotinyliert	Jackson/Dianova, Hamburg
Ms-anti-gt, Peroxidase gekoppelt	Jackson/Dianova, Hamburg
Rb-anti-gt, biotinyliert	Jackson/Dianova, Hamburg
Gt-anti-rb, biotinyliert	Jackson/Dianova, Hamburg
Ms-Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)	DAKO, Hamburg
Rb-Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)	DAKO, Hamburg
Streptavidin-Biotin-Complex Kit	DAKO, Hamburg
Diaminobenzidin (DAB)	DAKO, Hamburg

Prinzip und Durchführung

Die Immunhistochemie beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei unterscheidet man die direkte und indirekte Methode, wobei letztere in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam. Hierbei wird ein gegen das zu untersuchende Epitop gerichteter Antikörper, der sogenannte Primärantikörper, eingesetzt. In einem weiteren Schritt wird der sogenannte Sekundärantikörper, welcher mit einem Enzym gekoppelt und gegen den Primärantikörper gerichtet ist, zugegeben. Nach Zugabe des entsprechenden Substrats, welches vom Enzym umgesetzt wird, kommt es zur Farbentwicklung. Als Verstärkersysteme haben wir in Abhängigkeit vom verwendeten Sekundärantikörper die PAP-Methode oder die Streptavidin-Biotin-Methode jeweils unter zur Hilfeahme kommerziell erhältlicher Kits eingesetzt. PAP steht dabei für Peroxidase-anti-Peroxidase und bezeichnet einen Komplex aus Enzym und Antikörpern. Die Antikörper entstammen dabei derselben Spezies wie der

Primärantikörper. Der Sekundärantikörper stellt damit eine Verbindung zwischen Primärantikörper und PAP-System her. Die Streptavidin-Biotin-Methode beruht auf einer hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin. Bei Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers bindet der Streptavidin-Enzym-Komplex an diesen und führt nach Zugabe des Substrats zu einer verstärkten Farbentwicklung.

Es wurde wie folgt vorgegangen:

Kryoschnitte	Paraffinschnitte
<ul style="list-style-type: none"> - Auftauen der Schnitte unter Vermeidung von Kondenswasserbildung - Fixierung: 4% Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten - Waschen: 3x 10 Minuten in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) - Inkubation in Methanol und 1,5% Wasserstoffperoxid bei RT für 10 Minuten 	<ul style="list-style-type: none"> - Inkubation bei 37°C über Nacht (O/N) - Deparaffinisierung: 2x 10 Minuten in Xylol - Hydratisierung: absteigende Alkoholreihe bis zu destilliertem Wasser - Erhitzen: in Zitratpuffer (10 mM, pH=6) bei 96°C für 20 Minuten - Abkühlen auf RT - Waschen: 3x 10 Minuten in PBS - Inkubation in Methanol und 3% Wasserstoffperoxid bei RT für 10 Minuten
<ul style="list-style-type: none"> - Waschen: 3x 10 Minuten in 1x PBS - Absättigen unspezifischer Bindungen: 5% Serum der Spezies des Sekundärantikörpers in 1% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS - Primärantikörper: 5 bis 20 mg/ml in 1% BSA in PBS bei 4°C über Nacht - Waschen: 3x 10 Minuten in PBS - Sekundärantikörper: bei Verwendung der PAP-Methode nach Herstellerprotokoll, gt-anti-rb 1 µg/ml, rb-anti-gt 3,4 µg/ml, ms-anti-gt (Peroxidase gekoppelt) 1:25 - Waschen: 3x 10 Minuten in PBS - Verstärkersystem in Abhängigkeit vom verwendeten Sekundärantikörper: PAP-Methode beziehungsweise Streptavidin-Biotin-Methode: jeweils Vorgehen nach dem Herstellerprotokoll - Waschen: 3x 10 Minuten in PBS - Farbentwicklung: 20 µl DAB in 1ml Puffer - Bläuen zur Kernfärbung: Hämatoxylin für 10 bis 15 Sekunden, mit Leitungswasser abspülen - Aufsteigende Alkoholreihe - Einbettung in Xylol und Eukitt 	

2.3 *In situ*-Hybridisierung

Materialien und Geräte

Chaps	Sigma, München
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Heparin-Natrium 25000 IE/ml	B.Braun AG, Melsungen
Lammserum	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
Maleinsäure	Sigma, München
Resin AG 501-X8	BioRad, München
Tween-20	BioRad, München
Hefe transfer RNA (tRNA)	Sigma, München
Maxiprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Restriktionsendonukleasen (BamHI, EcoRI, XhoI), NEB Puffer 2, 3 und EcoRI, BSA	New England BioLabs, Frankfurt
Proteinase K	Sigma, München
Digoxigenin (DIG) <i>RNA Labeling Kit</i> (SP6/T7)	Roche, Mannheim
<i>Blocking reagent</i> , Katalognummer 1096176	Roche, Mannheim
Anti-DIG-AP, Fab-Fragmente	Roche, Mannheim
<i>BM purple</i>	Roche, Mannheim
Nitro-blue tetrazolium (NBT)/	
5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate (BCIP)	Roche, Mannheim
<i>Fast Red Tablets</i>	Roche, Mannheim
2-hydroxy-3-naphtoic acid-2'-phenylanilide phosphate (HNPP) <i>Fluorescent Detection Set</i>	Roche, Mannheim

PBT: PBS + 0,2% Tween-20

20xSSC, pH 4,5, 1l:

- 69,2 g Natriumcitrat
- 13,7 g Zitronensäure
- 175 g Natriumchlorid

Deionisiertes Formamid:

Zuabe von Resin AG 501-X8 (5g/100ml) zu Formamid. Inkubation bei Raumtemperatur für 40 Minuten, filtern, aliquotieren und bei -20°C lagern.

Prehybridisierungs-Lösung mit folgenden Endkonzentrationen:

- 50% deionisiertes Formamid
- 5x SSC, pH 4,5
- 0,2% Tween-20
- 0,5% Chaps
- 2% Blocking reagent
- 50 $\mu\text{g/ml}$ tRNA
- 50 $\mu\text{g/ml}$ Heparin
- 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8,0
- bei 70°C inkubieren bis sich das *Blocking Reagent* gelöst hat

Lösung I:

- 50% Formamid
- 5x SSC, pH 4,5
- 0,2% Tween-20
- 0,5% Chaps

Lösung II:

- 50% Formamid
- 2x SSC, pH 4,5
- 0,2% Tween-20
- 0,1% Chaps

Lösung III:

- 0,1% Chaps
- 2x SSC, pH 4,5
- 0,2% Tween-20

5x MAB, 1l:

- 58 g Maleinsäure
- 44 g Natriumchlorid
- mit Miliporewasser auf 800 ml auffüllen

- pH mit Natriumhydroxid-Plätzchen auf 7,5 einstellen
- mit Miliporewasser auf 1 l auffüllen

1x MABT: 1x MAB + 0,2% Tween-20

Blocking Lösung:

- 1x MABT
- 2% *Blocking reagent*
- 20% Lammserum
- bei 70° inkubieren, bis sich das *Blocking Reagent* aufgelöst hat
- Auf Eis stellen

NTMT, 200 ml:

- Natriumchlorid 5 M: 4 ml
- Tris 1M, pH 9,5: 20 ml
- Magnesiumchlorid 1 M: 10 ml
- Tween-20: 200 µl

Prinzip und Durchführung

Bei der *in situ*-Hybridisierung (ISH) werden DNA- oder RNA-Sonden verwendet, welche zur untersuchenden RNA komplementär sind. Dabei sind die eingesetzten Sonden mit einem Hapten (bei uns: Digoxigenin) oder direkt mit fluoreszierenden Molekülen markiert. Die Sonden binden an komplementäre Nukleinsäuren im zu untersuchenden Gewebe. Hierzu müssen die DNA-Doppelstränge vorher getrennt werden. Dies geschieht mittels Erhitzung. Durch Zugabe von Formamid kann hierbei der Schmelzpunkt gesenkt werden. Nicht gebundene Sonden werden ausgewaschen. Anschließend wird ein Antikörper, der gegen das verwendete Hapten gerichtet ist, zugegeben. Zudem ist der Antikörper – ähnlich wie bei der Immunhistochemie – mit einem Enzym, in der Regel Alkalische Phosphatase oder Peroxidase, markiert. In einem weiteren Schritt wird nun das entsprechende Enzymsubstrat zugegeben, welches dann durch das Enzym in einer Farbreaktion sichtbar wird.

Die DNA-Sonden für die ISH wurden von Plasmiden *in vitro* transkribiert. Die Plasmidkonstrukte wurden uns freundlichweise von Professor Rüdiger Klein, Alessandro Filosa und Sonia Paixao zur Verfügung gestellt (Filosa et al. 2009). Die

Plasmide wurden in *E. coli* amplifiziert, mittels Maxiprep-Kits von Qiagen nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt und mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen linearisiert (EphA4 antisense: BamHI, sense: XhoI, EphB3 antisense: BamHI, sense: EcoRI). Ein 20- μ l-Restriktionsverdau enthielt 8 μ g Plasmid-DNA, 0,8 μ l Enzym (entspricht 16 *Units*), 2 μ l Puffer (NEB-Puffer 3 für BamHI, NEB-Puffer 2 für XhoI und HindIII, NEB Puffer EcoRI für EcoR) und 0,2 μ l BSA und wurde für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die nun in linearisierter Form vorliegenden Plasmide mit Phenol-Chloroform aufgereinigt:

- (1) Zugabe von Phenol-Chloroform im Verhältnis 1:1
- (2) Zentrifugation: 15 Sekunden bei 13000 Runden pro Minute (rpm)
- (3) Abpipettieren der durchsichtigen Wasserphase, Interphase und organische Phase verwerfen
- (4) Chloroform zugeben, Schritt (2) und (3) wiederholen
- (5) Ethanol-Präzipitation: 1/10 des geschätzten Volumens der wässrigen DNA-Lösung in Form von 3M Natrium-Acetat, pH 7 zugeben sowie die 2,5-fache Menge 100% Ethanol, mindestens 15 Minuten bei -70°C präzipitieren, 10 Minuten zentrifugieren und Überstand verwerfen.
- (6) Pellet mit 70% Ethanol waschen und anschließend fünf Minuten zentrifugieren
- (7) Pellet trocknen lassen und in 25 μ l Wasser resuspendieren.

Von den linearisierten und aufgereinigten Plasmiden wurde pro Ansatz 1 μ g DNA in einem Gesamtansatz von 13 μ l für die *in-vitro*-Transkription mit DIG-Markierung verwendet. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen (DIG RNA Labeling Kit). Es wurden 2 μ l 10x Nukleosidtriphosphat (NTP) Labeling Mix, 2 μ l 10x Transkriptionspuffer, 1 μ l RNase Inhibitor und 2 μ l der Polymerasen T7 (EphA4 sense, EphrinB3 antisense) beziehungsweise Sp6 (EphA4 antisense, EphrinB3 sense) zugegeben. Der Gesamtansatz wurde drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz 100 μ l Tris-EDTA (TE)-Puffer, 10 μ l 4M Lithiumchlorid (LiCl) sowie 300 μ l 100% Ethanol zugegeben. Es folgte eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm. Danach wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Dann wurde wieder für zehn Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen. Diesmal wurde für sechs Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde auf Eis

getrocknet und dann in 100 µl TE Puffer resuspendiert, auf vier Tubes mit je 25 µl verteilt und bis zum Gebrauch bei –80°C eingefroren. Die ISH selbst wurde wie folgt durchgeführt.

- Inkubation in 80% Methanol und 6% Wasserstoffperoxid bei RT für 1 Stunde
- Inkubation in 50% Methanol in PBT bei RT für 5 Minuten
- Inkubation in 25% Methanol in PBT bei RT für 5 Minuten
- Inkubation 3x 5 Minuten in PBT
- Proteinverdau: Proteinase K (20 µg/ml) in PBT bei RT für 3 (10 µm-Kryoschnitte), 5 (20 µm-Kryoschnitte) beziehungsweise 13 Minuten (80 µm-Vibratonschnitte)
- Waschen: 2x 5 Minuten in PBT auf Eis
- Postfixation: 4% PFA, 0,2% Glutaraldehyd auf Eis für 20 (10 µm-Kryoschnitte), 30 (20 µm-Kryoschnitte) beziehungsweise 40 Minuten (80 µm-Vibratonschnitte)
- Waschen: 2x 5 Minuten in PBT
- Prehybridisierung: Prehybridisierungs-Lösung bei 70°C für eine Stunde
- Hybridisierung: Proben in Prehybridisierungs-Lösung bei 70°C über Nacht
- Waschen: 4x 20 Minuten in Lösung I bei 70°C
- Waschen: 4x 20 Minuten in Lösung II bei 66°C
- Waschen: 2x 20 Minuten in Lösung III bei 66°C
- Waschen: 2x 20 Minuten in Lösung III bei 68°C
- Waschen: 2x 5 Minuten in MABT bei RT
- Waschen: 2x 30 Minuten in MABT bei 70°C
- Absättigen unspezifischer Bindungen: *Blocking* Lösung bei RT für eine Stunde
- Antikörperhybridisierung: Anti-DIG-Antikörper (375 mU/ml) in *Blocking* Lösung bei 4°C über Nacht
- Waschen: 12x 20 Minuten in MABT bei RT
- Waschen: 2x 15 Minuten in NTMT
- Farbentwicklung: NBT/BCIP in NTMT für Kryoschnitte, *BM purple* für Vibratonschnitte jeweils nach dem Herstellerprotokoll

2.4 Zellkultur für humane Zellen inklusive Separation und Stimulation von Immunzellen

Materialien und Geräte

Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
<i>QIAzol Lysis Reagent</i>	Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, München
Interferon (IFN) γ	Roche, Mannheim
IFN β	Klinikum Großhadern, München
Interleukin (IL)-1 β	R&D Systems, Cambridge, UK
Tumornekrosefaktor (TNF)	Roche, Mannheim
Tumorstromungsfaktor (TGF) β	R&D Systems, Cambridge, UK
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	
<i>Recombinant Human Ephrin-A3/Fc Chimera</i>	R&D Systems, Cambridge, UK
<i>Recombinant Human Ephrin-B3/Fc Chimera</i>	R&D Systems, Cambridge, UK
<i>Human IgG, Fc-Fragment</i>	Jackson/Dianova, Hamburg
<i>Gt-anti-human IgG, Fcγ</i>	Jackson/Dianova, Hamburg
<i>MACS Cell Separator</i>	Milleniyi Biotech, Bergisch Gladbach
<i>MACS MS Separation Columns</i>	Milleniyi Biotech, Bergisch Gladbach
<i>MACS Pan T Cell Isolation Kit II human</i>	Milleniyi Biotech, Bergisch Gladbach
<i>MACS Monocyte Isolation Kit II human</i>	Milleniyi Biotech, Bergisch Gladbach
<i>Pancoll human, Dichte = 1,077 g/ml</i>	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

Medium

- RPMI 1640
- FCS 10% für humane Vorhaut-Fibroblasten, T-Zellen und Monozyten, 20% für humane Astrozyten
- 5 U/ml Penicillin, 5 ug/ml Streptomycin

Kultur von humanen Vorhaut-Fibroblasten (HFF) und Astrozyten

Humane Fibroblasten, welche im Rahmen einer Zirkumzision gewonnen wurden, wurden uns freundlicherweise von Herr Dr. Korn und Frau Dr. Schmidt vom Institut

für Klinische und Molekulare Virologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus flüssigem Stickstoff auf Eis gegeben und dann möglichst schnell in handwarmen Wasser aufgetaut. Die Zellen wurden in 40 ml Medium resuspendiert. Dann wurden die Zellen in einem 50 ml-Falcon Tube zehn Minuten bei 4°C und 1300 rpm abzentrifugiert, in RPMI resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid (CO₂) kultiviert. Zum Splitten der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 ml Trypsin je Vertiefung der 6er Kulturflasche. Die Zellen wurden für 3 bis 5 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend von der Oberfläche gelöst und in PBS zentrifugiert.

HFFs beziehungsweise Astrozyten wurden mit 0,1 U/μl IFN_γ, 0,025 ng/μl TNF_α, 0,05 ng/μl IL-1_β, 1,0 U/μl, IFN_β oder mit 0,01 ng/μl TGF_β stimuliert und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Zum Ernten der Zellen wurde am nächsten Tag das Medium entfernt und die Zellen mit 1x PBS gespült. Anschließend wurde soviel QIAzol Lysis Reagent zugegeben, dass der Boden bedeckt war. Zellen und QIAzol Lysis Reagent wurden mit der Pipette aufgenommen und in ein Tube überführt. Diese wurden dann bei -80°C eingefroren oder direkt – im Rahmen der RNA-Aufreinigung - weiterverwendet.

Astrozyten für Microarray-Analyse

Astrozyten wurden in einer 24-Well-Platte in jeweils 0,75 ml Zellkulturmedium mit dimerisiertem Ephrin-A3 und Ephrin-B3 (Endkonzentration: jeweils 2 μg/ml, Negativkontrolle 1 μg/ml) über Nacht in Triplikaten stimuliert. *In vivo* ist eine fokale Konzentration der Ephrine auf der Zelloberfläche für die Signalübertragung entscheidend (Kullander und Klein 2002). Diese fokale Konzentration wurde *in vitro* durch eine Dimerisierung („*Preclustering*“) mittels eines Antikörpers gegen die Fc-Domäne der als Ephrin-Fc-Fusionsproteine vorliegenden rekombinanten Proteine erreicht.

Von folgenden Ansätzen (Gesamtansatz jeweils 36,6 μl) wurden nach Inkubation für eine Stunde jeweils 8,25 μl pro Well der Astrozytenkultur zugegeben und über Nacht stimuliert:

1. EphrinA3-Fc 180 μg/ml und gt-anti-human-IgG-Fc_γ 130 μg/ml in PBS

2. Ephrin-B3-Fc 180 µg/ml und gt-anti-human-IgG-Fc γ 130 µg/ml in PBS
3. Negativkontrolle: human FcG 99 µg/ml und gt-anti-human-IgG-Fc γ 130 µg/ml in PBS

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen geerntet, die RNA der Zellen extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die Microarray-Untersuchung erfolgte am Ma-Planck-Institut (MPI) für Psychiatrie in München.

Dichtezentrifugation mit Pancoll zur Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus EDTA Blut

10 ml frisch gewonnenes EDTA-Blut wurde in ein steriles, konisches 50 ml Röhrchen überführt, mit PBS auf 35 ml aufgefüllt und auf je 15 ml Pancoll überschichtet. Anschließend erfolgte eine 40-minütige Zentrifugation bei 20°C und 400 g. Hierbei werden die Zellpopulationen unter dem Einfluss der Zentrifugalkraft entsprechend ihrer Dichte getrennt. Die lympho- und monozytenhaltige Interphase (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurde abpipettiert, in ein neues konisches 50 ml Tube überführt und 2x mit PBS gewaschen.

Lebende Zellen wurden nach Färbung der toten Zellen mit Tryptanblau in einer Zählkammer nach Neubauer gezählt.

Isolierung von humanen T-Zellen aus PBMCs

T-Zellen wurden aus PBMCs mit dem *MACS Pan T cell Isolation Kit II* gewonnen. Das Prinzip ist dabei die Depletion aller Nicht-T-Zellen durch magnetische Partikel, sogenannte *Microbeads*, und Antikörper gegen nicht auf T-Zellen exprimierte Oberflächenmarker wie CD19, CD36, CD56, CD123 und CD235a (Glykophorin A). Es handelt sich hierbei um eine Negativselektion. Die biotynilierten Antikörper binden an die entsprechenden Oberflächenmoleküle. Magnetische anti-Biotin-*Microbeads* binden wiederum an diese Antikörper. Die magnetisch markierten Zellen werden dann auf eine Säule (MACS-Säule) in einem starken Magnetfeld (MACS-Zellseparator) gegeben. Markierte Zellen und damit Nicht-T-Zellen werden in der Säule festgehalten. T-Zellen können, da sie nicht magnetisch markiert sind, die Säule durchfließen und können so eluiert werden. Bei der Durchführung wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen.

Isolierung von humanen Monozyten aus PBMCs

Die Isolierung humaner Monozyten erfolgte mit dem *MACS Monocyte Isolation Kit II human* durch Depletion aller Nicht-Monozyten durch magnetische Partikel, sogenannte *Microbeads*, und Antikörper gegen nicht auf Monozyten exprimierte Oberflächenmarker wie CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und CD235a (Glykophorin A). Es handelt sich hierbei um eine Negativselektion. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen.

Kultur von humanen T-Zellen und Monozyten

Bei T-Zellen und Monozyten handelt sich um Zellen, die in RPMI1640-Medium mit 10% FCS und 1% Pen/Strep kultiviert wurden.

T-Zellen wurden *in vitro* mit 0,1 U/ μ l IFN γ , 0,5 ng/ μ l Ionomycin (Iono) in Kombination mit 0,005 ng/ μ l PMA und mit 0,1 μ g/ μ l Glatirameracetat für 24 Stunden stimuliert. Monozyten wurden *in vitro* mit 0,025 ng/ μ l TNF α , 0,2 U/ μ l IFN γ , 0,3 ng/ μ l LPS und 0,1 μ g/ μ l Glatirameracetat für 24 Stunden stimuliert.

2.5 Microarray

Prinzip und Durchführung

Microarray-Analysen erlauben je nach Hersteller die parallele Analyse von ungefähr 48 000 Transkripten in einer geringen Menge biologischen Probenmaterials. Es wird mRNA (*messenger RNA*) aus dem zu untersuchenden Gewebe beziehungsweise der zu untersuchenden Zellen extrahiert und in cDNA (*complementary DNA*) oder cRNA (*complementary RNA*) umgeschrieben, welche dann mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wird. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Arrays werden *Silica Beads* mit einem Durchmesser von 3 μ m durch van-der-Waals- und hydrostatische Kräfte in den Vertiefungen einer Mikrowellplatte gehalten. An jedes *Silica Bead* sind dabei hunderte bis tausende Kopien eines spezifischen Oligonukleotids gebunden. Wird nun die fluoreszenzmarkierte cDNA zugegeben hybridisiert diese an die komplementären Oligonukleotide. Nicht gebundene DNA wird ausgewaschen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt dann nach Anregung mit einem Laser und korreliert mit der Expressionsrate eines Gens.

Die Microarray-Untersuchung erfolgte im Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München.

2.6 RNA-Extraktion

Materialien und Geräte

<i>miRNeasy Mini Kit</i> (50)	Qiagen GmbH, Hilden
<i>QIAshredder</i> (250)	Qiagen GmbH Hilden
<i>RNase-Free DNase Set</i> (50)	Qiagen GmbH Hilden
Sterile, RNase-freie Pipettenspitzen	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe
Trizol TRI Reagent	Sigma, München
<i>Photometer GeneQuant II DNA/RNA</i>	GE Healthcare Life Sciences, München

Prinzip und Durchführung der RNA-Extraktion mit dem miRNeasy Mini Kit

Für die RNA-Extraktion aus Zellkultur wurde das *miRNeasy-Kit* von Qiagen benutzt und nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Die Extraktion der RNA beruht hierbei auf der Bindung von RNA an eine Silicagel-Membran und auf mehreren Mikrozentrifugationsschritten. Die Zellen wurden in Qiazol lysiert. Eine Homogenisierung des Lysats wurde durch Zentrifugation in QIAshredder Spinsäulen erreicht. Die anschließende Zugabe von Ethanol führt zu einer Optimierung der Bindungsbedingungen. Die Proben wurden auf *RNeasy* Mini-Säulen aufgetragen. Die RNA bindet an die Silicagel-Membran der Säulen, der Rest wird ausgewaschen. Die RNA wurde mit RNase-freiem Wasser eluiert. Der im mitgelieferten Handbuch optionale Schritt des DNase-Verdau mit dem *RNase-Free-DNase-Set* wurde fest ins Protokoll integriert.

RNA aus Hirngewebe von MS-Patienten und Kontrollspendern wurde mittels einer Phenol/Guanidin-Isothiocyanat/Chloroform-Extraktion gewonnen (Chomczynski und Sacchi 1987). RNA wurde aus sieben demyelinisierten inaktiven und acht demyelinisierenden, aktiven Läsionen sowie aus sechs Kontrollblöcken isoliert.

Photometrisch wurden dann Konzentration und Reinheit der Gesamt-RNA bestimmt.

2.7 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Materialien und Geräte

High-Capacity cDNA

Reverse Transkription Kit

Applied Biosystems, Darmstadt

Mastercycler Gradient

Eppendorf, Hamburg

Prinzip und Durchführung

Für die Reverse Transkription wurde das *High-Capacity cDNA* Reverse Transkription Kit von Applied Biosystems benutzt und nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Alle Kit-Komponenten mit Ausnahme der Polymerase wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde der *RT Master Mix* zubereitet: 2 µl RT Puffer, 0,8 µl 25x NTP Mix (100 mM), 2 µl 10x *RT Random Primers*, 1 µl *MultiScribe* Reverse Transkriptase, 1 µl RNase-Inhibitor und 2 µl Nuklease-freies Wasser wurden zusammen pipettiert und dann alles auf Eis gestellt. Dann wurden jeweils 10 µl des 2x *RT Master Mix*s in ein PCR-Tube gegeben und jeweils 10 µl der RNA-Probe dazu pipettiert. Im *Mastercycler* wurde untenstehendes Programm durchlaufen (Tab. 2).

Tab. 2: Einzelne Schritte im Thermocycler bei der reversen Transkription.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25°C	37°C	85°C	4°C
Zeit	10 min	120 min	5 s	

Min Minuten, s Sekunden.

2.8 qRT-PCR und LDA-Analysen

Materialien und Geräte

qPCRTM Cor Kit mit

Eurogentec S.A., Seraing, Belgien

- Reaktionspuffer 10x
- Magnesiumchlorid (MgCl₂) 25mM
- Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)

RNase-freiese Wasser (H₂O)

Gibco/Invitrogen, Darmstadt

Uracil DNA Glykosidase (UNG)

1500IU, 1 U/µl

Eurogentec S.A., Seraing, Belgien

<i>AmpliAq</i> Gold Polymerase 5U/μl	Eurogentec S.A., Seraing, Belgien
<i>MicroAmp Optical</i> 96-well <i>Reaction Plate</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>ABI Prism Optical Adhesive</i> Covers	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>Low Density Arrays</i> (LDA)	Applied Biosystems, Darmstadt
7900 HT Fast Real-Time PCR-System	Applied Biosystems, Darmstadt
RQ Manager 1.2 Software	Applied Biosystems, Darmstadt

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Vorwärts-Primer (Exon 2): 5` - GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3`

Rückwärts-Primer (Exon 4): 5` - GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC – 3`

Sonde (Exon 4): 5` - FAM – CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC – TAMRA – 3`

Alle Metabion GmbH, Martinsried

TaqMan Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Darmstadt
EfnA3, Hs00191913_m1	
EfnB3, Hs00154861_m1	
EphA4, Hs00177874_m1	
EphA7, Hs00177891_m1	
EphB6, Hs00270052_m1	
EphA2, Hs00171656_m1	
IL-11, Hs00174148_m1	
IL-6st; Hs00174360_m1	
<i>Neuroblastoma Breakpoint Family member 1</i> (NBPF1), Hs00429706_m1	
<i>p21 activated Kinase</i> (PAK2,) Hs00605586_m1	
<i>Zinc finger and BTB domain-containing Protein 20</i> (ZBTB20), Hs00210321_m1	

Prinzip und Durchführung

QRT-PCR steht für *Realtime quantitative PCR*, auch als RTq-PCR oder quantitative Echtzeit-PCR bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR. Ergänzend kann bei der qRT-PCR zudem eine Quantifizierung der eingesetzten DNA via Fluoreszenz-Messung vorgenommen werden. Neben diversen Sonden, die bei der qRT-PCR eingesetzt werden, kommt hier unter anderem auch die sogenannte *Taqman*-Sonde, auch Hydrolyse-Sonde genannt, zum Einsatz. Dies erfolgt unter Einsatz eines

Quenchers-Farbstoffes am 5`-Ende (FAM) und eines Reporter-Farbstoffes am 3`-Ende (TAMRA). Erfolgt die Anregung der intakten Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Resonanz Energie-Transfer (FRET) unterdrückt. Im Rahmen der Extension kommt es nun zur Sondenhydrolyse, es kommt zur Unterbrechung des FRET und zur Zunahme der Reporter-Fluoreszenz. Diese Zunahme korreliert mit der PCR-Produktzunahme (Abb. 4).

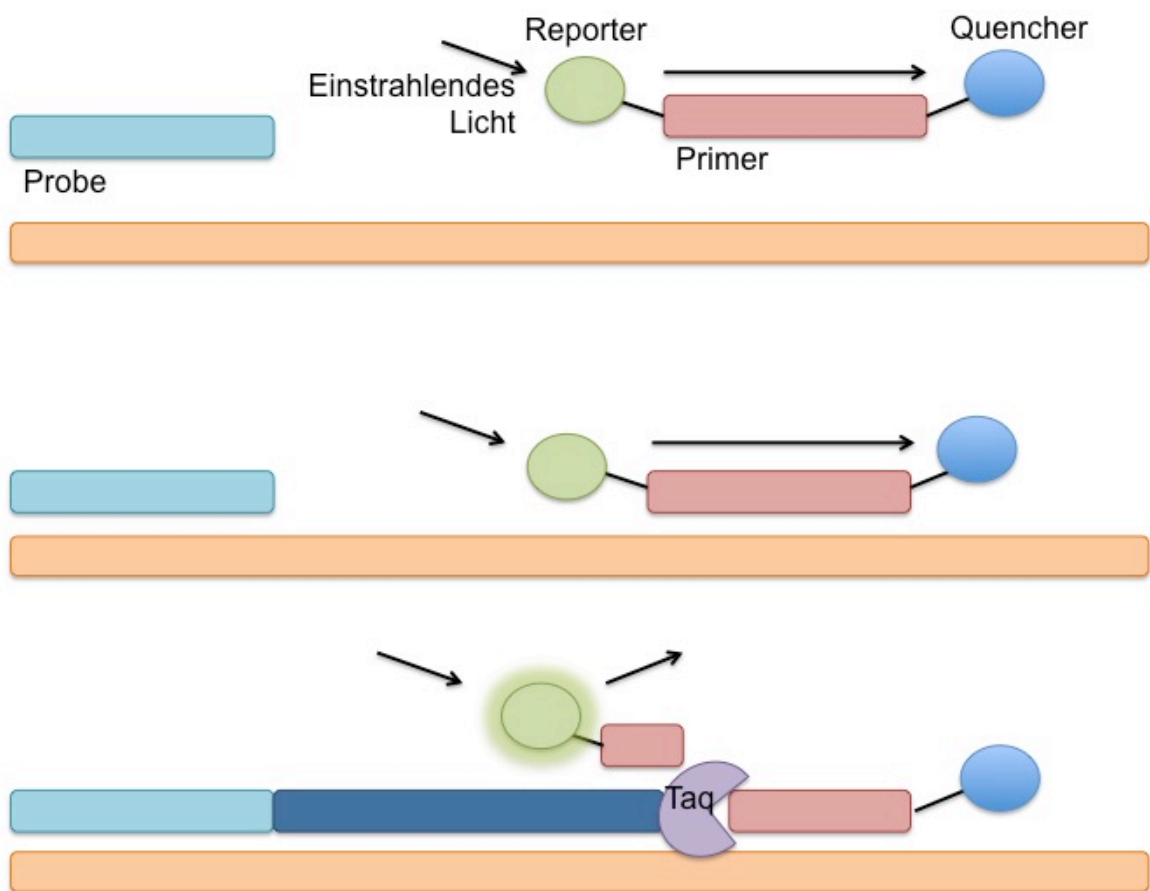


Abb. 4: Funktionsprinzip der qRT-PCR unter Verwendung einer Taqman-Sonde, modifiziert nach (Koch 2004).

Im Rahmen unserer Experimente haben wir stets die relative Quantifizierung angewandt, das heißt unter Verwendung eines sogenannten Referenzgens (bei uns: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, kurz GAPDH). Ein Vergleich der Expression mit dem Referenzgen ist in der exponentiellen Phase der Reaktion über die Differenz der C_T -Werte (auch als *Threshold Cycle* bezeichnet) möglich. Der C_T -Wert gibt jene Zykluszahl an, bei der ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die

Grundlinie erreicht wird. Unter der Annahme einer hundertprozentigen Effizienz kommt es zur einer Verdopplung des Reaktionproduktes pro Zyklus. Daher lässt sich aus dem ΔC_T -Wert die Expression des Zielgens im Verhältnis zum Referenzgen berechnen.

$$\text{Zielgen/Referenzgen} = 2^{-\Delta C_T}$$

Primer und *Master Mix* wurden lichtgeschützt und auf Eis aufgetaut. Das Pipettierschema stellte sich wie folgt dar (siehe Tabelle 3).

Tab. 3: Pipettierschema für die qRT-PCR, Gesamtvolumen 25 μ l pro Reaktion.

	Endkonzentration	Pipettiertes Volumen in μ l
Master Mix		
Reaktionspuffer 10x	1x	2,50
MgCl ₂ 25mM	5mM	5,00
dNTP 2,5mM	200 μ M	2,00
RNasefreies H ₂ O		0,13
UNG	0,01 U/ μ l	0,25
AmpliTaq Gold Polymerase 5 U/ μ l	0,025 U/ μ l	0,13
Primer Mix	5x	5,0
cDNA in H ₂ O	25-50 ng/well	10

Die PCR selbst erfolgte unter zur Hilfenahme des 7900 HT *Fast Real-Time* PCR-Systems und die Auswertung mit der entsprechenden Software.

Die Analyse der MS-Läsionen erfolgte mittels *TaqMan*-PCR auf Microfluidic-Karten. Hierbei erfolgt die Verteilung der cDNA und Polymerase auf Wells mit vorab maschinell aufgebracht und lyophilisierten Primern mittels Zentrifugation über Flüssigkeitskanäle (Applied Biosystems *TaqMan Low Density Array*). Auf diese Weise können pro Karte bis zu 384 Transkripte gemessen werden.

2.9 Mäuse und Genotypisierung

Mäuse

EphA4^{-/-}- und EphA4^{+/+}-Mäuse wurden uns freundlicherweise von Professor Rüdiger Klein, Alessandro Filosa und Sonia Paixao zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Mäuse mit dem gemischten Hintergrund C57BL/6xSV129 (Kullander et al. 2001). Aufgrund dieses gemischten Hintergrundes wurden für alle Versuche für jede EphA4^{-/-}-Maus jeweils ein Nachkommen desselben Wurfes als Kontrolle verwendet um einen Selektionsbias diesbezüglich zu verhindern. EphA4^{-/-}- Mäuse zeigen einen spezifischen Phänotyp in Form eines hoppelnden Ganges.

Materialien und Geräte

NTP	NEB, Frankfurt
Taq DNA Polymerase mit ThermoPol Puffer	BioLabs, Frankfurt
PTC-200, Peltier Thermal Cycler	MJ Research, St. Bruno, Kanada
DNA Engine, Peltier Thermal Cycler	BioRad, München

EphA4 wildtype (wt)

Vorwärts-Primer: 5` - CAA TCC GCT GGA TCT AAG TGC CTG TTA GC – 3`

Rückwärts-Primer: 5` - ACC GTT CGA AAT CTA GCC CAG T – 3`

EphA4 knockout (ko)

Vorwärts-Primer: 5` - GAC TCT AGA GGA TCC ACT AGT GTC GA -3`

Rückwärts-Primer: 5` - TTT TCT CCC TCT TTA AGC AAG GAT CAA GC -3`

alle Metabion, Martinsried

Prinzip und Durchführung

Den mit Ether narkotisierten Mäusen wurde ein kleines Stück der Schwanzspitze abgeschnitten und in ein 1,5 ml Tube gegeben. Dann wurde 100 µl 50 mM Natriumhydroxid (NaOH) zugegeben und dreimal fünfzehn Minuten bei 95°C inkubiert. Es wurden 10 µl 1,5 M Tris, pH 8,8, zugegeben. Dann wurden in PCR-Tubes pro Ansatz 5 µl 10x Puffer, 0,4 µl NTPs, 0,5 µl Primer (Rckwärts- und Vorwärts-Primer unverdünnt im Verhältnis 1:1), 0,2 µl Taq-Polymerase, 41,9 µl Wasser und 2 µl DNA pipettiert. Die PCR-Tubes wurden verschlossen und kurz bei 1600 rpm und 4°C zentrifugiert. Das PCR-Rogramme setzte sich aus den in Tabelle

4 dargestellten Schritten zusammen. Anschließend wurden die Proben in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Tab. 4: Einzelne Schritte bei der PCR im Rahmen der Genotypisierung.

Allel	Primer	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5	Schritt 6
EphA4 wt	EphA4wtF + EphA4wtR	2min bei 95°C	30s bei 95°C	1min 30s bei 68°C	1min 15s bei 72°C	30x Schritt 2-4	6min bei 72°C
EphA4 ko	EphA4koF + EphA4koR	3min bei 94°C	1min bei 94°C	1min bei 65°C	1min bei 72°C	37x Schritt 2-4	20min bei 72°C

F Vorwärtsprimer, R Rückwärtsprimer, s Sekunden, min Minuten.

2.10 Scoring

Um den Schweregrad der EAE beurteilen zu können, haben wir ein *Scoring* System benutzt. Dieses System enthält sechs Stufen, null bis fünf, zur Kategorisierung, wobei auch Zwischenwerte wie zum Beispiel 2,5 erteilt werden können. Nach der Immunisierung wurden die Mäuse täglich gewogen und gescort. Diese Einteilung wurde schriftlich festgehalten umso Manifestation, Schweregrad und Verlauf der Erkrankung beurteilen zu können.

Das *Scoring* System enthielt folgende Punkte:

- 0: gesundes Tier
- 1: Tier mit schlaffem Schwanz
- 2: Tier mit vermindertem Stellreflex und/oder Gang
- 3: Tier mit einem gelähmten Hinterbein
- 4: Tier mit zwei gelähmten Hinterbeinen
- 5: sterbendes oder bereits an der EAE verstorbenes Tier

2.11 Immunsisierung der Mäuse

Materialien und Durchführung

Pertussistoxin	List Biological Laboratories, Campbell, US
Inkomplettes Freund's Adjuvant (IFA)	Difco, Augsburg
Mycobacterium tuberculosis	Difco, Augsburg

Prinzip und Durchführung

Den mit Ether narkotisierten Mäusen wurde 200 µg MOG₃₅₋₅₅ in CFA (IFA + 5mg/ml Mycobacterium tuberculosis) subkutan sowie 400 ng Pertussistoxin intraperitoneal injiziert. Zwei Tage später wurde die intraperitoneale Injektion von Pertussistoxin wiederholt.

2.12 Einzellzellsuspension und Zellkultur für murine Zellen

Materialien und Geräte

FCS	Invitrogen, Darmstadt
Glutamin	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Pen/Strep	Gibco/Invitrogen, Deutschland
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen, Darmstadt
40 µm-Zellfilter	BD, Heidelberg
anti-CD3	BD, Heidelberg
anti-CD28	BD, Heidelberg

Medium

- RPMI 1640
- 1x MEM nicht-essentielle Aminosäuren
- 1% Natriumpyruvat
- 1% Pen/Strep
- 1% Glutamin

Prinzip und Durchführung

Milz und Lymphknoten wurden jeweils auf einen 40 µm-Zellfilter gegeben und mittels eines Spritzenkolbens homogenisiert. Das durch den Filter hindurchtretende Homogenisat entspricht einer Einzellzellsuspension und wurde in einem 50 ml-Falcontube aufgefangen. Die gewonnenen Zellen wurden in Percoll bei einer Dichte von 1,035 g/ml resuspendiert und bei 20°C 30 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphase abpipettiert und in eine 96well-Platte überführt und bei 1600 rpm und 4°C vier Minuten zentrifugiert. Es wurden pro Well einer 96well-Platte 2×10^5 Zellen ausplattiert und in 200 µl RPMI-Medium und 10% FCS bei 5% CO₂ kuliviert. Im Hinblick auf geplante Proliferationsassays und ELISAs (*Enzyme linked immunosorbent assay*) wurden die Zellen mit jeweils 0,2, 2,0 und 20 µg/µl MOG₃₅₋₅₅, rekombinantem MOG (rMOG) oder antiCD3 beziehungsweise mit der bei uns im Labor ermittelten optimalen Konzentration von 0,5 µg/µl antiCD3 in Kombination mit 1,0 µg/µm antiCD28 stimuliert. Wenn im Weiteren ein Zytokin-ELISA geplant war, erfolgte die Stimulation für 72 Stunden, bei einem Proliferationsassay für insgesamt 64 Stunden.

2.13 Proliferationsassay

Materialien und Geräte

³ H-Thymidin	GE Healthcare, München
β-Zähler	Wallace, Finnland

Prinzip und Durchführung

³H-Thymidin wird von proliferierenden Zellen in die neu synthetisierte DNA aufgenommen. Die Menge der aufgenommenen DNA und damit die Proliferationsrate korreliert mit dem gemessenen radioaktiven Signal.

Zellen die im Rahmen einer Einzellzellsuspension gewonnen wurden, wurden auf einer 96well-Platte - 2×10^5 Zellen pro Well - ausplattiert und in 200 µl RPMI-Medium und 10% FCS 48 Stunden kuliviert. Pro Well wurde 1 µCi ³H-markiertes Thymidin zugegeben und die Zellen weitere 16 Stunden kultiviert. Anschließend wurde die Zunahme der Radioaktivität gemessen und daraus die Proliferationsrate berechnet.

2.14 ELISA

Materialien und Geräte

IFN γ	eBioscience, Frankfurt
IL-2	BD, Heidelberg
IL-4	BD, Heidelberg
IL-5	BD, Heidelberg
IL-10	R&D Systems, Cambridge, UK
IgM	eBioscience, Frankfurt
IgG1	eBioscience, Frankfurt
IgG2a	eBioscience, Frankfurt
IgG2b	eBioscience, Frankfurt
IgG3	eBioscience, Frankfurt
<i>Streptavidin Horse Radish Peroxidase</i>	eBioscience, Frankfurt
2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline- 6-sulphonic acid (ABTS) Substrat	Sigma, München
96well-Platte	Costar/Corning, Amsterdam, Niederlande
Victor2, 1420 <i>Multilabel Counter</i>	Wallace, Finnland

ELISA Coating Puffer

- 0,1 M Karbonatpuffer, pH 9,5
- 8,4 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)
- 3,56 g Natriumcarbonat (Na₂CO₃)
- mit H₂O auf einen Liter auffüllen
- pH auf 9,5 einstellen

Waschpuffer

- 1x PBS
- 10% Fetales Rinderserum (FBS)

ELISA Assay Verdünnungspuffer

- 1x PBS
- 10% FBS

Substratlösung (außer IL-10, hierfür siehe Herstellerprotokoll)

- 150 mg ABTS
- 500 ml 0.1 M Zitronensäure
- pH 4.35
- kurz vor Verwendung + 30% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (11 µl pro 11 ml Puffer)

Stopp Lösung

- 20% Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfat*, SDS)
- 50% Dimethylformamid (DMF)

Prinzip und Durchführung

Der ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmunsorbent **A**ssay) beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Beim sogenannten Sandwich-ELISA ist ein Antikörper, der *Coating*-Antikörper, an eine 96well Platte gebunden. Es wird die Probe, mit dem enthaltenen Antigen zugegeben. Es erfolgt dann die Zugabe eines Detektions-Antikörpers (*Capture*-Antikörper), der ein anderes Epitop des Antigens als der *Coating*-Antikörper erkennt und bindet. Zudem ist dieser Antikörper biotiniliert. Es erfolgt die Zugabe von einem Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex, welches eine hohe Affinität für Biotin aufweist und an dieses bindet. In einem nächsten Schritt erfolgt dann die Zugabe eines chromogenes Substrats, welches vom Enzym im Rahmen einer Farbreaktion umgewandelt und so sichtbar gemacht wird.

Es wurde wie folgt vorgegangen. Die verwendeten Konzentrationen für *Coating*- und *Capture*-Antikörper sowie die weiteren Versuchsbedingungen in Abhängigkeit vom zu untersuchenden Zytokin beziehungsweise Antikörper finden sich in Tabelle 5.

- *Coating*: *Coating*-Antikörper in *Coating* Puffer bei 4°C über Nacht
- Waschen: 4x mit Waschpuffer
- Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit Assay-Verdünnungspuffer bei RT für eine Stunde
- Waschen: 6x mit Waschpuffer
- Auftragen von Zytokin-Standard und Proben in unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubation bei RT für zwei Stunden
- Waschen: 8x mit Waschpuffer

- Detektion: mit Biotin gekoppelter Detektions-Antikörpers in Assay-Verdünnungspuffer/PBS bei RT für eine Stunde
- Waschen: 10x mit Waschpuffer
- Verstärkung: Streptavidin-HRP in Assay-Verdünnungspuffer nach dem Herstellerprotokoll von eBioscience bei RT für eine Stunde
- Waschen: 12x mit Waschpuffer
- Entwicklung: ABTS Substrat bei RT für 10 bis 60 Minuten, Abstoppen der Farbentwicklung mit 20% SDS/50% DMF
- Auswertung: Optische Dichte (OD) bei 405 nm

Tab. 5: Genaue ELISA-Bedingungen und Endkonzentration in Abhängigkeit vom verwendeten Zytokin beziehungsweise Ig.

Zytokin	Coating-Antikörper	Coating Puffer	Blocking Puffer	Capture-Antikörper	Standard
IFN γ	1 μ g/ml	Capture-Antikörper in Karbonatpuffer, pH 9,5, 4°C, O/N	PBS + 10% FCS	0.5 μ g/ml	Beginnend bei 2000 pg/ml
IL-5	1 μ g/ml	Capture-Antikörper in Karbonatpuffer, 4°C, O/N	PBS + 10% FCS	0,5 μ g/ml	Beginnend bei 2000 pg/ml
IL-4	1 μ g/ml	Capture-Antikörper in Karbonatpuffer, 4°C, O/N	PBS + 10% FCS	0,5 μ g/ml	Beginnend bei 2000 pg/ml
IL-10	2 μ g/ml	Capture Antikörper in PBS, RT, O/N	PBS + 1% BSA	0,5 μ g/ml	Beginnend bei 2000 pg/ml
IL-2	1 μ g/ml	Capture Antikörper in Karbonatpuffer, 4°C, O/N	PBS + 10% FCS	0,5 μ g/ml	Beginnend bei 2000 pg/ml
Igs	0,5 μ g/ml			0,5 μ g/ml	Beginnend bei 500 ng/ml

2.15 Durchflusszytometrie

Materialien und Methoden

<i>Hank`s buffered salt solution (HBSS)</i>	Gibco/Invitrogen, München
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco/Invitrogen, München
Percoll	GE Healthcare, München
Anti-ms-B220	eBioscience, Frankfurt
Anti-ms-CD3, Allophycocyanin (APC)	BD, Heidelberg
Anti-ms-CD4, Peridinin-chlorophyll Protein (PerCP-Cy5.5)	eBioscience, Frankfurt
Anti-ms-CD8 , Phycoerythrin (PE)	eBioscience, Frankfurt
Anti-ms-CD11b, PE	eBioscience, Frankfurt
Anti-ms-CD11c, <i>Fluorescein isothiocyanate</i> (FITC)	BD, Heidelberg
Anti-ms-CD19, APC	BD, Heidelberg
Anti-ms-CD69, FITC	eBioscience, Frankfurt
Anti-ms-CD25, PE	BD, Heidelberg
40 µm-Zellfilter	BD, Heidelberg
96well-Platte	Nunc, Langenselbold
<i>FACSCalibur system</i> , CellQuest Software	BD, Heidelberg
WinMDI Software	Joe Trotter, The Scripps Institute, La Jolla, CA

Staining Puffer

- PBS
- 1% BSA
- 0.1% Natriumazid (10g Natriumazid in 50ml H₂O)

Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird auch als FACS (**F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting) bezeichnet. Sie beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Hierbei werden mit einem Fluorezenzfarbstoff markierte und gegen bestimmte Oberflächenmoleküle der zu untersuchenden Zellen gerichtete Antikörper eingesetzt. Nicht-gebundene Antikörper werden ausgewaschen. Bei der Passage eines Laserstrahls kommt es zur Emission von optischen Signalen durch Zellen, welche den Antikörper gebunden

haben. Mittels eines sogenannten *Photomultipliers* kann dabei gestreutes Licht, welches wiederum mit der Größe der Zellen korreliert, nachgewiesen werden.

Splenozyten und Immunzellen, die im Rahmen einer Zellsuspension gewonnen wurden, wurden in eine 96well-Platte mit V-Boden überführt und bei 1600 rpm und 4°C vier Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen resuspendiert. Es wurde dann ein oder mehrere Antikörper in *Staining* Puffer zugegeben, die gegen das zu untersuchende Oberflächenmolekül gerichtet waren (Anti-ms-B220 1:200, Anti-ms-CD3 1:200, Anti-ms-CD4 1:200, Anti-ms-CD8 1:200, Anti-ms-CD11b 1:1000, Anti-ms-CD11c 1:100, Anti-ms-CD19 1:200, Anti-ms-CD69 1:100, Anti-ms-CD25 1:200) . Dann wurde 20 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 150 µl *Staining* Puffer zugegeben und zentrifugiert. Es erfolgte ein Waschschrift. Anschließend wurde nochmals zentrifugiert und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert und in FACS-Tubes überführt.

2.16 Statistische Analyse und Software

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel für Mac 2011, Version 14.0.2 (101115), unter zur Hilfenahme des Plug-ins Merlin (<http://www.heckgrammar.co.uk/index.php?p=10310>) sowie mit GraphPad Prism für Windows. Die Abbildungen wurden mit Adobe Illustrator CS4 fertiggestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Ephrine und Eph-Rezeptoren in der Pathogenese der MS

3.1.1 Ephrine und Eph-Rezeptoren werden in MS-Läsionen vermehrt exprimiert

Die Expression von Eph-Rezeptoren und Ephrinen wurde mittels quantitativer PCR (LDA-Analysen) in aktiven und chronisch inaktiven Läsionen von MS-Patienten sowie entsprechendem Hirngewebe (weiße Substanz) von Kontrollpatienten ohne neurologische Erkrankung verglichen. Dazu wurde jeweils Autopsiematerial verwendet.

In aktiven Läsionen beobachteten wir eine vermehrte Expression insbesondere von *EFNA3*, *EFNA4*, *EFNB1*, *EPHA1*, *EPHA2*, *EPHA3*, *EPHA8* und *EPHB6* im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe (weiße Substanz). Dabei waren die beobachteten Werte für *EFNA4*, *EFNB1* und *EPHA2* nach Korrektur für multiples Testen aller 516 auf den TLDA gemessenen Gene (Benjamini und Hochberg 1995) auf einem Signifikanzniveau von 0,05 statistisch signifikant.

In inaktiven Läsionen beobachteten wir für *EFNA3*, *EFNA4*, *EFNA5*, für alle Ephrine der Gruppe B, für alle Eph-Rezeptoren der Gruppe A mit Ausnahme von *EPHA1*, *EPHA8* und *EPHA9* wie auch für alle Eph-Rezeptoren der Gruppe B mit Ausnahme von *EPHB2* eine vermehrte Expression im Vergleich zur weißen Substanz von gesundem Kontrollgewebe. Die vermehrte Expression von *EFNB3* erwies sich hierbei als statistisch signifikant.

Die Tabellen 6, 7, 8 und 9 zeigen eine zusammenfassende Darstellung der Expression von Ephrinen der Gruppe A und B sowie der zugehörigen Rezeptoren in aktiven und inaktiven MS-Läsionen im Vergleich zur weißen Substanz von gesundem Kontrollgewebe.

Tab. 6: Expression von Ephrinen der Gruppe A in Kontrollgewebe (n=6), aktiven (n=8) und inaktiven (n=7) MS-Läsionen in % *GAPDH* (Mittelwert).

	<i>EFNA1</i>	<i>EFNA2</i>	<i>EFNA3</i>	<i>EFNA4</i>	<i>EFNA5</i>
Kontrollgewebe	$5,2 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$
Aktive Läsionen	$5,1 \times 10^{-2}$	$7,7 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-3}$
Inaktive Läsionen	$4,0 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-3}$

Grün: keine Änderung, blau: verminderte Expression, gelb: vermehrte Expression, rot: stark vermehrte Expression.

Tab. 7: Expression von Ephrinen der Gruppe B in Kontrollgewebe (n=6), aktiven (n=8) und inaktiven (n=7) MS-Läsionen in % *GAPDH* (Mittelwert).

	<i>EFNB1</i>	<i>EFNB2</i>	<i>EFNB3</i>
Kontrollgewebe	$7,0 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-2}$	$5,1 \times 10^{-4}$
Aktive Läsionen	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$	$7,6 \times 10^{-4}$
Inaktive Läsionen	$1,2 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-2}$

Grün: keine Änderung, blau: verminderte Expression, gelb: vermehrte Expression, rot: stark vermehrte Expression.

Tab. 8: Expression von Eph-Rezeptoren der Gruppe A in Kontrollgewebe (n=6), aktiven (n=8) und inaktiven (n=7) MS-Läsionen in % *GAPDH* (Mittelwert).

	<i>EPHA1</i>	<i>EPHA2</i>	<i>EPHA3</i>	<i>EPHA4</i>	<i>EPHA5</i>	<i>EPHA6</i>	<i>EPHA7</i>	<i>EPHA8</i>	<i>EPHA10</i>
Kontrollgewebe	$2,4 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$7,8 \times 10^{-4}$	$5,8 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^{-5}$
Aktive Läsionen	$3,1 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$	$7,4 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$	$8,5 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-5}$
Inaktive Läsionen		$5,1 \times 10^{-3}$	$4,1 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-3}$	$5,9 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-2}$		$2,1 \times 10^{-4}$

Grün: keine Änderung, blau: verminderte Expression, gelb: vermehrte Expression, rot: stark vermehrte Expression.

Tab. 9: Expression von Eph-Rezeptoren der Gruppe B in Kontrollgewebe (n=6), aktiven (n=8) und inaktiven (n=7) in %*GAPDH* (Mittelwert).

	<i>EPHB1</i>	<i>EPHB2</i>	<i>EPHB3</i>	<i>EPHB4</i>	<i>EPHB6</i>
Kontrollgewebe	$2,9 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-3}$
Aktive Läsionen	$5,1 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$4,8 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^{-3}$	$6,3 \times 10^{-3}$
Inaktive Läsionen	$6,7 \times 10^{-3}$	$9,6 \times 10^{-3}$	$4,9 \times 10^{-3}$	$5,5 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-2}$

Grün: keine Änderung, blau: verminderte Expression, gelb: vermehrte Expression, rot: stark vermehrte Expression.

3.1.2 Verschiedene Anti-EPH- und Anti-EFN-Antikörper zeigen ein unterschiedliches Färbeverhalten im ZNS gesunder Kontrollen

Basierend auf den Ergebnissen aus den LDA-Analysen untersuchten wir zwei Ephrine (Ephrin-A3 und Ephrin-B3) sowie vier Eph-Rezeptoren (EphA2, EphA4, EphA7 und EphB6) im Zusammenhang mit der Pathogenese der MS genauer. Aus Diskussionen mit Professor Rüdiger Klein, einem Spezialisten für das Ephrin/Eph-System, sowie aus der aktuellen Literatur war bekannt, dass es nur wenige spezifische Antikörper für die Eph-Rezeptoren und deren Liganden gibt, die ein gutes Signal in der Immunhistochemie geben. Daher testeten wir für jedes zu untersuchende Ephrin beziehungsweise die entsprechenden Rezeptoren jeweils mindestens zwei unterschiedliche Antikörper um zu sehen, ob diese ein ähnliches Bild liefern. Die Antikörper wurden sowohl auf Kryo- als auch auf Paraffinschnitten getestet. Als Testgewebe haben wir uns für Hirngewebe von erwachsenen, gesunden Kontrollen entschieden. Leider erhielten wir für keines der Antikörperpaare vergleichbare Resultate (Tab. 10).

Tab. 10: Unterschiedliches Färbeverhalten verschiedener Antikörper im ZNS gesunder Kontrollen, empirisch.

Ephrin / Eph-Rezeptor	Antikörper 1	Antikörper 2
EFNA3	rb-anti-EFNA3: Astrozyten, vor allem perivaskuläre Endfüßchen	ms-anti-EFNA3: Neurone, Gefäße
EFNB3	rb-anti-EFNB3: Gefäße, Astrozyten, Neurone	gt-anti-EFNB3: keine Anfärbung
EPHA4	rb-anti-EPHA4: Gefäße, Neurone	ms-anti-EPHA4: keine Anfärbung
EPHA7	rb-anti-EPHA7: Gefäße (inkl. Meningen), Neurone, Astrozyten	ms-anti-EPHA7, IgM: Neurone
EPHB6	rb-anti-EphB6: Gefäße, Neurone	ms-anti-EphB6: Gefäße, Neurone

Die mitgeführten Positivkontrollen mit anti-CD68-Antikörpern beziehungsweise anti-hu-vWF-Antikörpern (hu-vWF: humaner von Willebrand Faktor) haben ohne Einschränkung funktioniert (Daten nicht dargestellt) und zeigen, dass sowohl das Gewebe intakt als auch die Färbetechnik problemlos waren.

Während der ms-anti-EFNA3-Antikörper vor allem Gefäße sowie Neuronen anfärbte, färbte der rb-anti-EFNA3-Antikörper im ZNS am ehesten gliale Zellen, wahrscheinlich Astrozyten. Unter Verwendung des letztgenannten Antikörpers auf einem anderen Gewebe bot sich ein sehr interessantes Bild. Dieser Antikörper scheint im Adenoid Gefäße anzufärben, die am ehesten hochendothelialen Venolen entsprachen. Dies sind besondere Gefäße, die speziell in sekundär lymphatischen Organen vorkommen und wesentlich an der Auswanderung von Lymphozyten in das Blut und in andere sekundäre lymphatische Organe beteiligt sind (Perry et al. 1996). Der ms-anti-EFNA3-Antikörper konnte dies wiederum nicht bestätigen. Positivkontrollen lieferten wiederum das erwartete Bild.

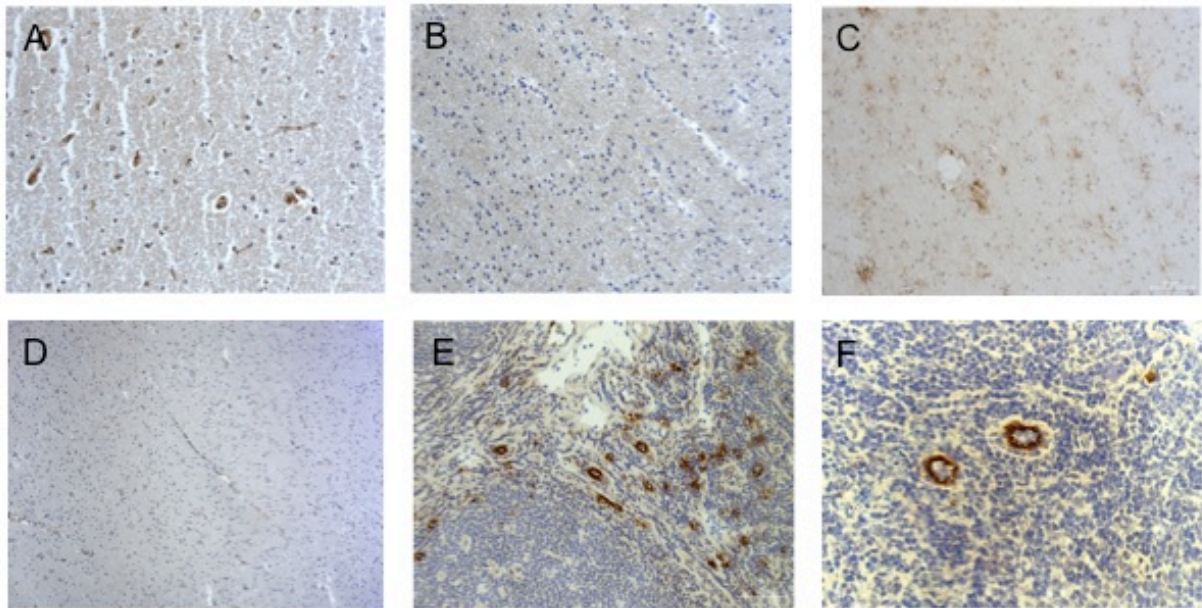


Abb. 5: Immunhistochemische Färbungen auf Gefrierschnitten: (A) Gehirn, rb-anti-EPHA4-AK, x10, (B) Gehirn, ms-anti-EPHA4-AK, x10, (C) Gehirn, rb-anti-EFNA3-AK, x5, (D) Gehirn, ms-anti-EFNA3-AK, x5, (E) und (F) Adenoid, rb-anti-EFNA3-AK, x5 beziehungsweise x20. DAB-Färbung (braun), Kernfärbung (blau) mit Hämalaun.

Da uns die Immunhistochemie kein einheitliches Bild bieten konnte, wendeten wir die *in situ*-Hybridisierung an. Die RNA-Sonden für murine EphA4- und Ephrin-B3-Transkripte erhielten wir aus der Gruppe von Professor Rüdiger Klein. Zunächst konnten diese Färbungen auf den auch von dieser Gruppe verwendeten 80 µm-dicken Vibratomschnitten in Hippocampi gesunder SJL/J-Mäuse reproduziert werden, wo *EphA4* und *EfnB3* stark exprimiert sind (Oksenberg et al. 2004). Da von den ZNS-Läsionen von MS Patienten nur Kryo- oder Paraffin-Schnitte verfügbar waren, versuchten wir das Protokoll auf diese Schnitte zu übertragen, was leider nicht erfolgreich war (siehe Abbildung 6).

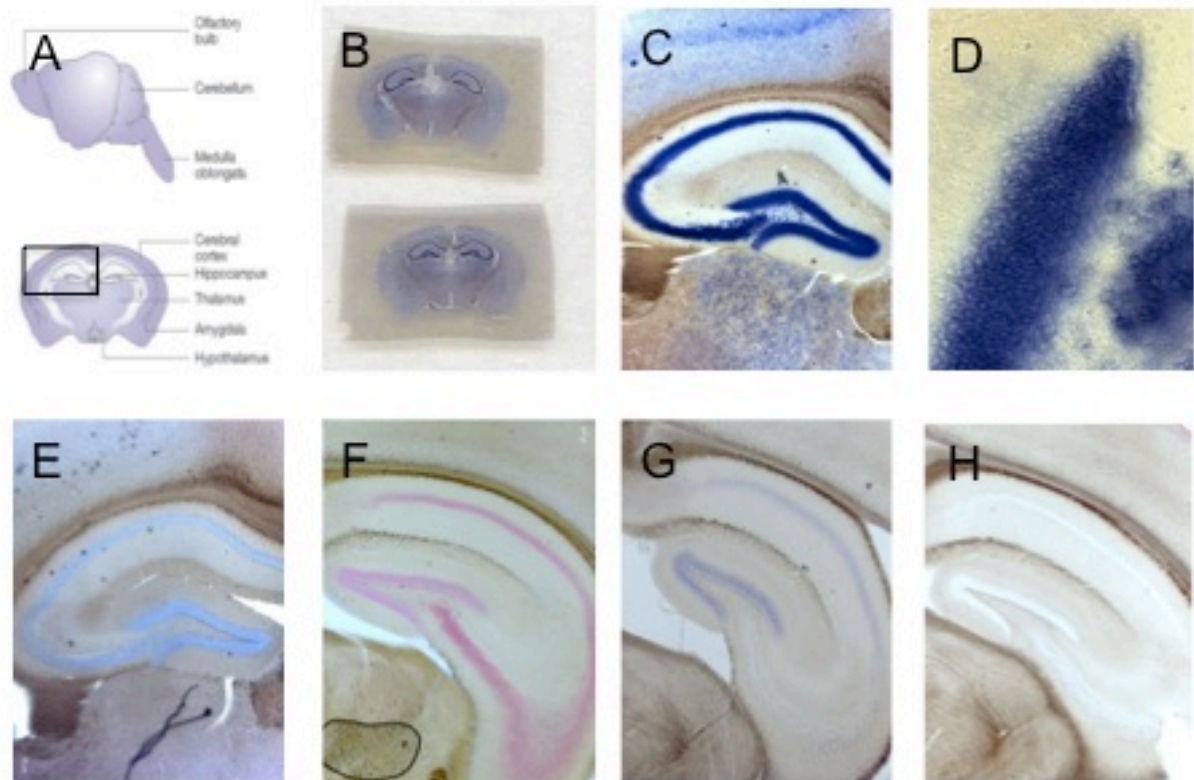


Abb. 6: *EphA4*- und *EfnB3*-Expression im Hippocampus, *in situ*-Hybridisierung auf Vibratomschnitten. Unter Verwendung des Substrats BM purple beziehungsweise NBT/BCIP (B, C, D, E, G, H) imponiert die Positivkontrolle kräftig blau, die Negativkontrolle entsprechend farblos/hellblau. Unter Verwendung des Substrats Fast Red (F) erscheint die Positivkontrolle rot, die Negativkontrolle wiederum farblos (nicht dargestellt): (A) Schematische Darstellung des Mäusegehirns mit Markierung des Hippocampus (Cryan und Holmes 2005) (B-D) zeigen die *EphA4*-Expression im Hippocampus makroskopisch (B), 5x (C) beziehungsweise 20x (D) vergrößert. (E) zeigt die zugehörige Negativkontrolle (5x). (F) *EphA4*-Expression im Hippocampus nach Anfärbung mit Fast Red, x5. (G) *EfnB3*-Expression im Hippocampus x5, zugehörige Negativkontrolle, x5: (H).

3.1.3 Astrozyten *in vitro*, T-Zellen und Monozyten *ex vivo* exprimieren Ephrine und Eph-Rezeptoren und zeigen ein verändertes Expressionsprofil nach der Stimulation mit verschiedenen Zytokinen

Wir stellten uns die Frage, welche Zellen Ephrine und Eph-Rezeptoren exprimieren und wie die Expression von Eph-Rezeptoren und Ephrinen in Astrozyten und durch Zytokine reguliert wird.

Humane Astrozyten *in vitro* exprimieren vor allem *EPHA2* und *EPHA4* und in einem weitaus geringeren Ausmaß *EFNB3*, *EPHA7*, *EPHB6* und *EFNA3*. Nach Stimulation mit $IL-1\beta$ und $INF\gamma$ wird *EPHA4* vermindert exprimiert, nach Stimulation mit $TGF\beta$ und $INF\beta$ beobachtet man dagegen eine Steigerung der Expression auf das 1,6-

beziehungsweise 1,4-fache des in unstimulierten Astrozyten gemessenen Ausgangswertes. Nach Stimulation mit $Il-1$, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$, $TGF\beta$ und $IFN\beta$ *in vitro* wird *EPHA2* auf Astrozyten vermehrt exprimiert. Wir konnten eine Steigerung der Expression nach Stimulation mit $Il-1\beta$ auf das 1,9-fache, mit $IFN\gamma$ auf das 1,6-fache, mit $TNF\alpha$ auf das 2,3-fache, mit $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ auf das 1,9-fache, mit $TGF\beta$ auf das 2,6-fache und nach Stimulation mit $IFN\beta$ auf das 2,3-fache des in unstimulierten Astrozyten bestimmten Ausgangswertes beobachten (Abb. 7). Murine Astrozyten exprimierten konstitutiv vor allem *EphB6*, in einem geringeren Ausmaß *EphA4* sowie *EphA2* und *EfnA3* (Daten nicht dargestellt).

Die konstitutive Expression von Ephrinen und deren Rezeptoren sowie die Induktion beziehungsweise Reduktion dieser in Abhängigkeit von der Stimulation mit verschiedenen Zytokinen ist zusammenfassend in Tabelle 11 und 12 dargestellt.

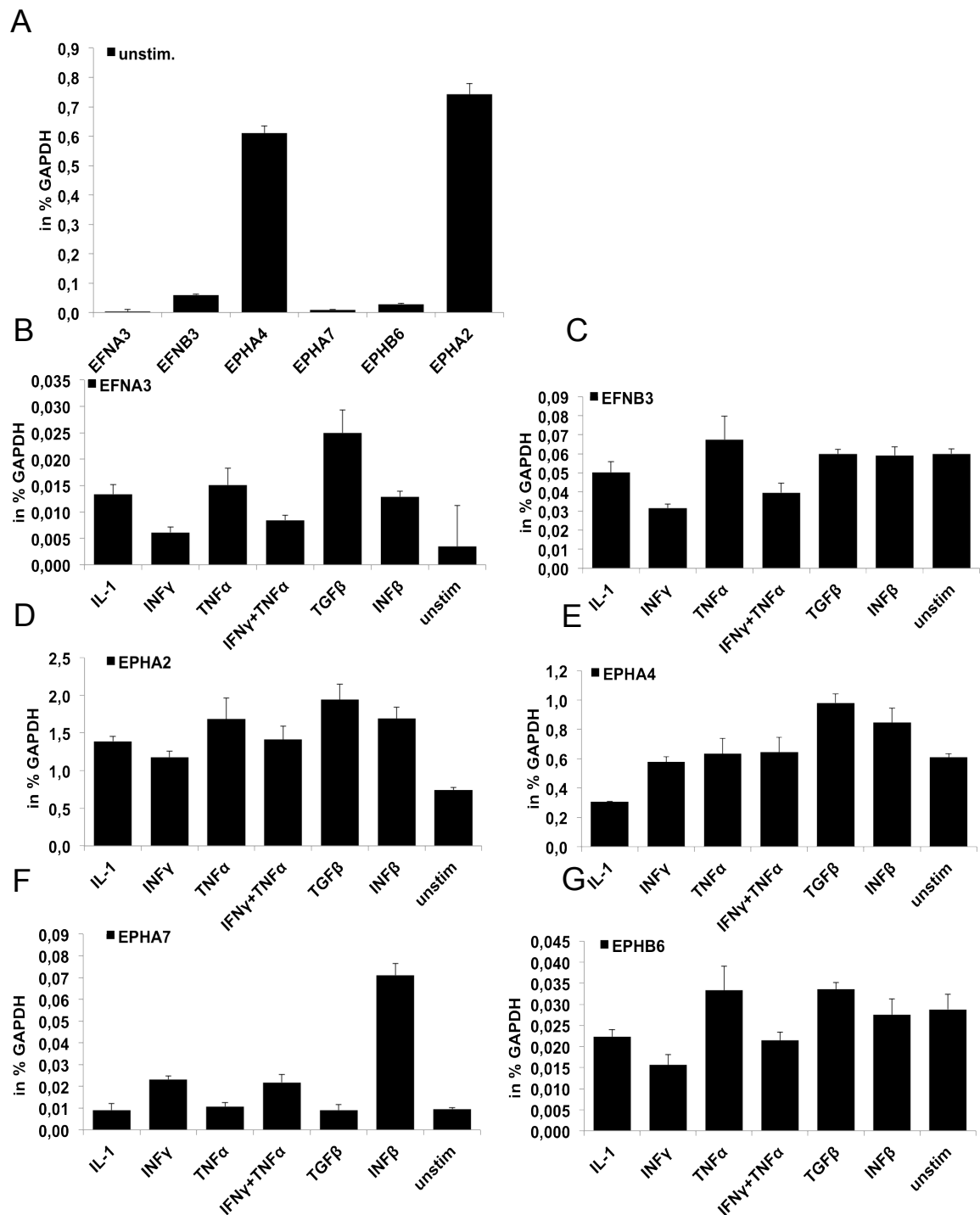


Abb. 7: Expression von Eph-Rezeptoren und Ephrinen durch primäre humane Astrozyten *in vitro* Mittelwert und Standardabweichung von technischen Duplikaten in % GAPDH. (A) Expression von EFNA3, -B3, EPHA4, EPHA7, EPHB6 und EPHA2 durch naive Astrozyten EFNA3- (B), EFNB3- (C), EPHA2- (D), EPHA4- (E), EPHA7- (F) und EPHB6-Expression (G) vor und nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen.

Tab. 11: Konstitutive Expression von Ephrinen und deren Rezeptoren durch primäre Astrozyten (n=2).

	<i>EPHA2</i>	<i>EPHA4</i>	<i>EPHA7</i>	<i>EPHB6</i>	<i>EFNA3</i>	<i>EFNB3</i>
Primäre Astrozyten	+++	+++	+	+	+	+

Tab. 12: Induktion/Reduktion von *EFNA3*, *EFNB3*, *EPHA2*, *EPHA4*, *EPHA7* und *EPHB6* durch Zytokine (n=2) in primären Astrozyten.. Dargestellt ist der Mittelwert der x-fachen Änderung der Expression nach Stimulation mit Zytokinen im Vergleich zum Ausgangswert.

	IFN β	IFN γ	TNF α	IFN γ + TNF α	TGF β	IL-1
<i>EFNA3</i>	3,7	1,8	4,4	2,4	7,2	3,9
<i>EFNB3</i>	2,3	0,5	1,1	0,7	1,0	0,8
<i>EPHA2</i>	2,3	1,6	2,3	1,9	3,6	1,9
<i>EPHA4</i>	1,4	1,0	1,0	1,1	1,6	0,5
<i>EPHA7</i>	7,5	2,5	1,1	2,3	0,9	2,1
<i>EPHB6</i>	1,0	0,5	1,2	0,7	1,2	0,8

Grün: keine Änderung, blau: verminderte Expression, gelb: vermehrte Expression.

Erste präliminäre Daten bezüglich der Expression von Ephrinen und Eph-Rezeptoren auf T-Zellen und Monozyten, konnten zeigen, dass T-Zellen *ex vivo* vor allem *EPHA4* und *EPHB6* und in einem weitaus geringeren Maß *EPHA2*, *EFNA3* und *-B3* exprimieren, wohingegen Monozyten *ex vivo* vor allem *EPHB6* und in einem geringeren Ausmaß *EPHA4*, *EPHA2*, *EFNA3* und *EPHA7* exprimieren (Abb. 8). Unstimulierte Monozyten exprimieren vor allem EphB6 und EphA4. T-Zellen wurden mit Ionomycin in Kombination mit PMA stimuliert, welches zur vermehrten intrazellulären Produktion, unter anderem von Zytokinen, Interferonen, Il-2 und -4 führt. Nach Stimulation der Monozyten *in vitro* mit TNF α beobachteten wir eine vermehrte Expression von *EPHA7* und *EFNB3*. Eine vermehrte Expression von *EFNB3* zeigte sich auch nach Stimulation mit LPS und Copaxone (Daten nicht dargestellt).

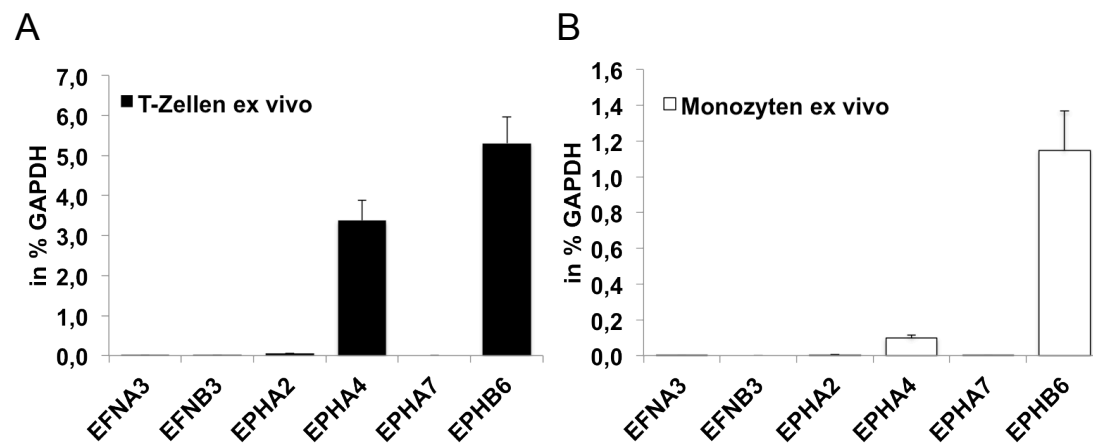


Abb. 8: Konstitutive Expression von *EFNA3*, *EFNB3*, *EPHA2*, *EPHA4*, *EPHA7* und *EPHB6* durch T-Zellen (A) und Monozyten (B). Mittelwert und Standardabweichung von technischen Duplikaten in % *GAPDH*.

3.1.4 Ephrin-A3 und Ephrin-B3 führen nicht zu einer detektierbaren Regulation des Transkriptom in Astrozyten *in vitro*

Kultivierte Astrozyten wurden mit Ephrin-A3 und -B3 stimuliert, die als F_c -Fusionsproteine vorlagen und über die F_c -Domäne dimerisieren, was für die Zellstimulation entscheidend ist (Kullander und Klein 2002). Als Kontrolle wurden F_c -Fragmente alleine verwendet.

Insgesamt wurde hierbei mittels Microarray die konstitutive Genexpression diverser Gene untersucht und dann die Veränderung der Expression nach Stimulation im Verhältnis zur Kontrolle, das heißt Stimulation mit F_c , angegeben. In einem zweiten Schritt, haben wir die Expression der meistregulierten Gene im *Microarray*-Screening - namentlich *IL-11*, *IL-6ST*, *NBPF1*, *PAK2* und *ZBTB20* –mittels qPCR bestimmt. Dies sollte der Verifizierung der *Microarray-Daten* dienen.

In den *Microarray*-Analysen fiel die Expression von *IL-11* nach Stimulation mit Ephrin-A3- F_c auf 10% des Ausgangswertes ab und stieg nach Stimulation mit Ephrin-B3- F_c auf das 1,3-fache des Ausgangswertes an. Sowohl *IL-6ST* als auch *NBPF1*, *PAK2* und *ZBTB20* wurden sowohl durch Ephrin-A3- F_c als auch nach Stimulation mit Ephrin-B3- F_c vermehrt exprimiert. Bei *IL-6ST* beobachteten wir eine Steigerung der Expression auf das 1,4-fache des Ausgangswertes nach Stimulation mit Ephrin-A3- F_c und auf das 1,3-fache nach Stimulation mit Ephrin-B3- F_c . Bei *NBPF1* beobachtete man eine vermehrte Expression um 40% nach Stimulation mit Ephrin-A3- F_c und um 20% nach Stimulation mit Ephrin-B3- F_c . *PAK2* wurde nach Stimulation mit Ephrin-A3-

F_c und Ephrin-B3-F_c jeweils um 50% vermehrt exprimiert. Bei *ZBTB20* beobachteten wir eine Steigerung der Expression auf das 1,4-fache nach Stimulaion mit Ephrin-A3-F_c und auf das 1,3-fache nach Stimulation mit Ephrin-B3-F_c (Daten nicht dargestellt). Allerdings waren diese Unterschiede zwischen den jeweiligen Triplikaten nicht signifikant. In einer anschließenden, quantitativen PCR konnten diese Unterschiede auch aus derselben RNA, die für die *Microarray*-Analyse verwendet wurde, nicht bestätigt werden. Während *NBPF1* und *ZBTB20* auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert wurden, wurden *IL-11* sowie *IL-6ST* geringfügig mehr exprimiert. *PAK2* wurde von den untersuchten Genen auf dem höchsten Niveau exprimiert (Abb. 9).

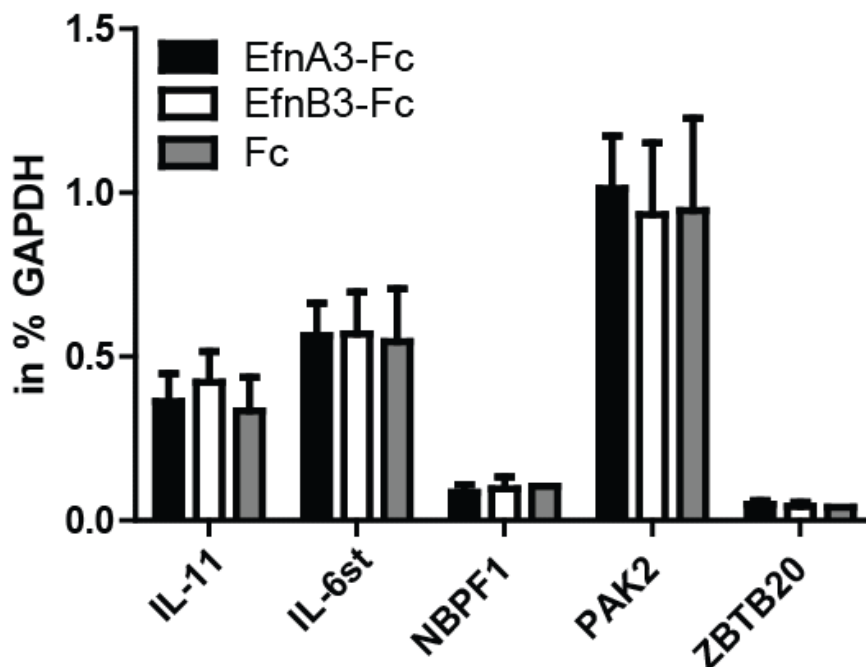


Abb. 9: Quantitative Bestimmung der Expression von *IL11*, *IL6ST*, *NBPF1*, *PAK2* und *ZBTB20* durch primäre Astrozyten *in vitro* nach Stimulation mit Ephrin-A3-F_c, Ephrin-B3-F_c beziehungsweise F_c mittels qPCR. Mittelwert und Standardabweichung von technischen Triplikaten.

3.2 EphA4 in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

3.2.1 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis in EphA4^{+/-}-, EphA4^{-/-}- und EphA4^{+/-}-Mäusen

EphA4^{+/-}-, EphA4^{+/-}- und EphA4^{-/-}-Mäuse wurden genotypisiert und entsprechend in Gruppen eingeteilt. Die Tiere wurden entsprechend Alter und Geschlecht randomisiert. In einem ersten Versuch wurden männliche und weibliche EphA4^{+/-}-

und EphA4^{-/-}- Mäuse mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Entwicklung und Verlauf der EAE wurden anhand des international bekannten *Score*-Systems (siehe Material und Methoden) täglich beurteilt. Während bei den EphA4^{+/+}-Mäusen eine EAE-Inzidenz von 100% zu beobachten war, erkrankten bei den EphA4^{-/-}-Mäusen nur 75% der Tiere innerhalb des Beobachtungszeitraums von 22 Tagen. Während die EphA4^{+/+}-Mäuse durchschnittlich am 14.Tag nach der Immunisierung erkrankten, einen durchschnittlichen maximalen *Score* von 4,0 aufwiesen und zwei Tiere sogar im Rahmen der EAE verstarben, erkrankten die EphA4^{-/-}-Tiere durchschnittlich erst am 16.Tag und wiesen einen durchschnittlichen maximalen klinischen *Score* von 1,33 auf. In der Gruppe der EphA4^{-/-}-Mäuse verstarb keines der Tiere. Dabei war der beobachtete Unterschied bezüglich des maximal erreichten mittleren klinischen *Scores* ab dem 14. Tag nach Immunisierung auf einem Signifikanzniveau von 0,01 und ab dem 18.Tag nach Immunisierung bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes auf einem Signifikanzniveau von 0,05 statistisch signifikant (Abb. 10A). Da bei diesem ersten Versuch nur eine begrenzte Anzahl an Versuchstieren zur Verfügung stand, haben wir ihn mit einer größeren Anzahl an Tieren sowie mit einer zusätzlichen Gruppe (EphA4^{+/-}) wiederholt. Die EphA4^{+/+}-Tiere wiesen eine Inzidenz von 55,5% auf, erkrankten durchschnittlich am 14.Tag nach der Immunisierung und erreichten einen durchschnittlichen maximalen klinischen *Score* von 2,4. Die EphA4^{-/-}-Tiere erkrankten durchschnittlich am 16.Tag mit einer Inzidenz von 37,5% und erreichten einen durchschnittlichen maximalen klinischen *Score* von 1,7. Der beobachtete Unterschied zwischen EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäusen bezüglich der Krankheitsschwere war dabei am 16. und 17.Tag nach Immunisierung auf einem Signifikanzniveau von 0,05 und vom 17. bis zum 20.Tag nach Immunisierung auf einem Signifikanzniveau von 0,01 statistisch signifikant. Die heterozygoten Tiere dagegen erkrankten ebenso wie die EphA4^{+/+}-Mäuse durchschnittlich am 14.Tag und wiesen eine Inzidenz von 90% und einen maximalen durchschnittlichen klinischen *Score* von 2,0 auf. Der Unterschied zwischen EphA4^{+/+}- und EphA4^{+/-}-Mäusen bezüglich des maximal erreichten mittleren klinischen *Scores* war am 16. und 21.Tag nach Immunisierung auf einem Signifikanzniveau von 0,01 sowie vom 17. bis zum 20.Tag nach Immunisierung auf einem Signifikanzniveau von 0,001 statistisch signifikant. Zwischen EphA4^{-/-}- und EphA4^{+/-}-Tieren zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied (Abb. 10B). Im Wesentlichen entsprachen damit die Ergebnisse wiederum dem ersten Versuch. Ein wesentlicher Unterschied bestand

allerdings in den maximal erreichten durchschnittlichen klinischen Scores, die in diesem zweiten Versuch, sowohl bei den EphA4^{+/+}- als auch bei den EphA4^{-/-}-Mäusen, niedriger als im Vorversuch waren.

In einem weiteren Immunisierungsversuch unter Einschluss von acht EphA4^{+/+}- und sechs EphA4^{-/-}-Mäusen und einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen erkrankten die EphA4^{+/+}-Tiere durchschnittlich am 12.Tag, wiesen eine Inzidenz von 100% auf und erreichten einen durchschnittlichen maximalen klinischen Score von 2,4. Die EphA4^{-/-}-Tiere wiesen eine Inzidenz von 67% auf, erkrankten durchschnittlich am 12.Tag und erreichten einen durchschnittlichen maximalen klinischen Score von 2,3. Bei den EphA4^{-/-}-Tieren verstarb eines am 14.Tag nach Immunsierung im Rahmen der EAE. Der beobachtete Unterschied zwischen den Gruppen war dabei zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant (Abb. 10C).

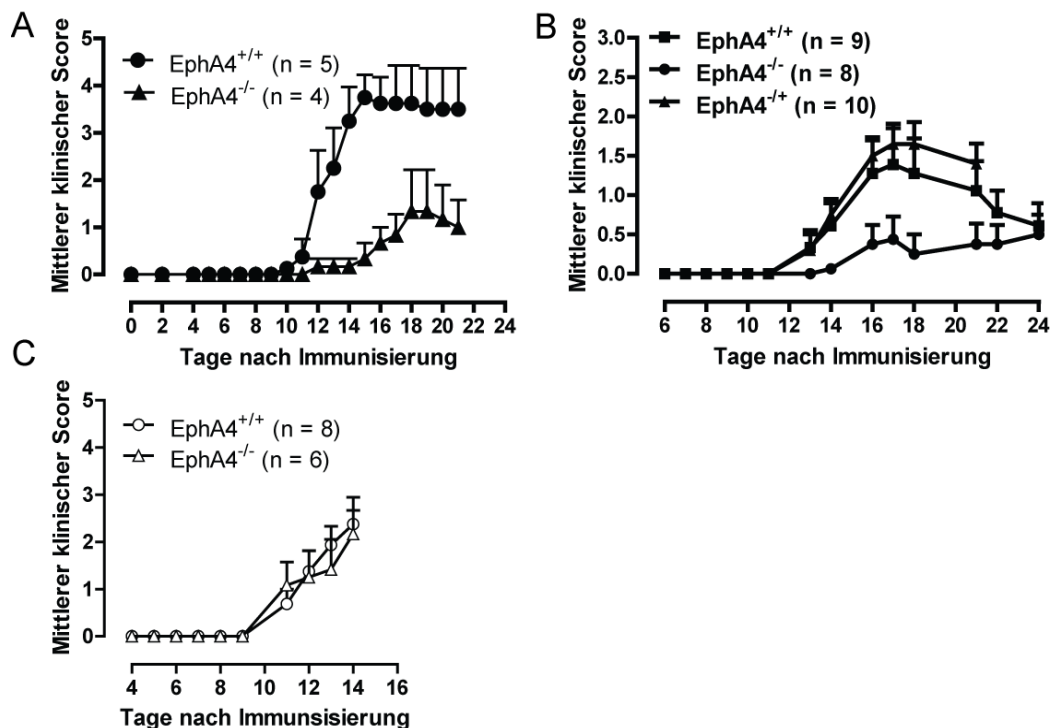


Abb. 10: Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchsreihen (A, B, C). (A, B) Mildere EAE in EphA4^{-/-}-Mäusen. (C) Die Daten konnten in einem weiteren Immunisierungsversuch nicht bestätigt werden. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung des mittleren klinischen Scores.

3.2.2 Immunisierte und erkrankte EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}- Mäuse zeigen histologisch eine typische EAE-Pathologie

Am 22.Tag nach der Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ wurden die EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}- Mäuse des ersten Versuches getötet. An der medizinischen Universität Wien,

Österreich, wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Professor Hans Lassmann Rückenmarks- und Gehirnblocke der Tiere in Paraffin eingebettet, Schnitte angefertigt, histologisch gefärbt und analysiert; insbesondere im Hinblick auf Entzündungszeichen sowie stattgefundener Demyelinisierung. Im Detail wurden zwei EphA4^{+/+}-Mäuse mit einem klinischen *Score* von 2,0 und drei EphA4^{-/-}-Mäuse mit einem klinischen *Score* von 0, 1,0 und 2,0 genauer analysiert. Die Ergebnisse wurden uns freundlicherweise von Professor Hans Lassmann zur Verfügung gestellt.

Immunhistochemisch zeichnet sich eine EAE-Läsion durch eine Demyelinisierung der Axone, einen Axonverlust wie auch durch die Einwanderung von Immunzellen aus. So kann ein Myelinverlust in der Läsion mittels der Markscheidenfärbung nach Klüver-Barrera sichtbar gemacht werden. Mittels der Bielschowsky-Silbernitrat-Färbung kann ein Axonverlust nachgewiesen werden. Die vermehrte Einwanderung von Immunzellen wird immunhistochemisch mittels Antikörpern, welche gegen spezifische Oberflächenmoleküle der zu untersuchenden Immunzellklasse gerichtet sind (z.B. anti-Mac3 für Makrophagen, anti-CD3 für T-Zellen), gezeigt.

Zusammenfassend konnten sowohl bei EphA4^{+/+}-Mäusen als auch bei EphA4^{-/-}-Mäusen mit dem klinischen *Score* von jeweils 2,0 immunhistochemisch eine ausgeprägte Demyelinisierung, ein ausgeprägter Axonverlust sowie die Einwanderung von T-Zellen und Makrophagen und damit zusammenfassend ausgeprägte Läsionen im Sinne einer EAE beobachtet werden (Abb. 11A). Im Vergleich hierzu zeigten EphA4^{-/-}-Tiere, welche zum Untersuchungszeitpunkt einen klinischen *Score* von 1 aufwiesen, ein geringeres Ausmaß an Demyelinisierung, Axonverlust und eine verminderte Anzahl eingewanderter Immunzellen.(Abb. 11C). Entsprechend zeigten sich bei klinisch unauffälligen EphA4^{-/-}-Tieren (*Score* 1,0) kaum die Stigmata der EAE-Pathologie (Abb. 11B). Das Ausmaß der Entzündung im Rückenmark, der Demyelinisierung im Rückenmark und Gehirn (Daten nicht dargestellt) unterschieden sich nicht zwischen den verschiedenen Genotypen. Sowohl bei den EphA4^{-/-}- als auch bei den EphA4^{+/+}-Tieren zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Schweregrad der EAE und histologischem Ausmaß von Entzündung, Demyelinisierung und Axonverlust.

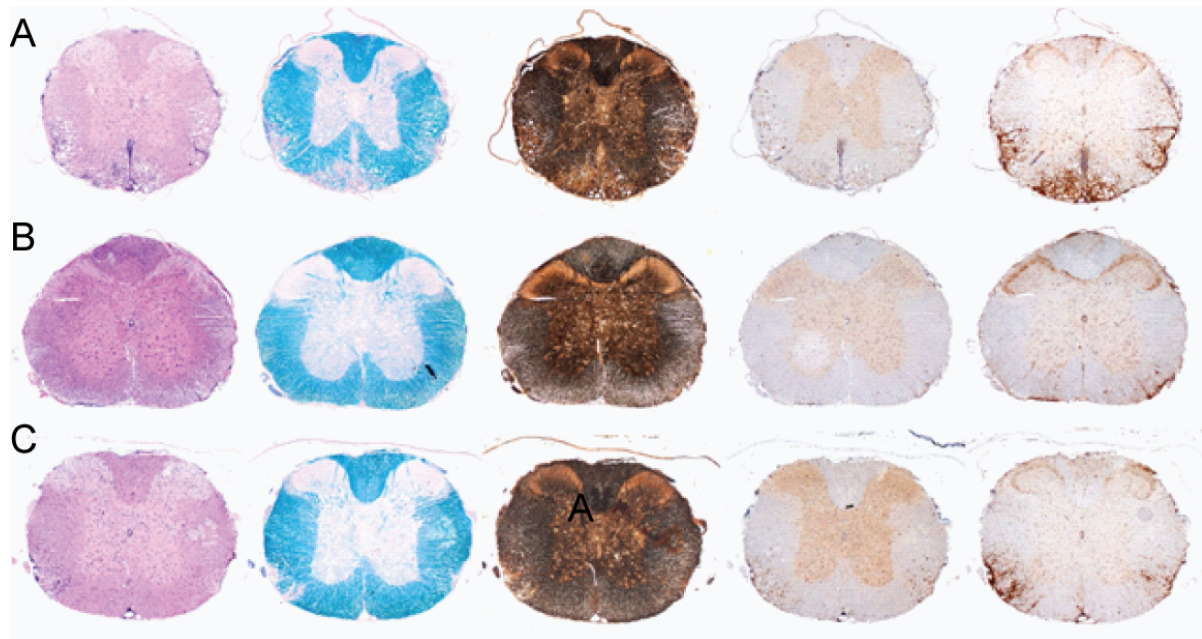


Abb. 11: Erkrankte EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäuse unterschieden sich nach Immunisierung im Hinblick auf den Genotyp histologisch nicht. Von links nach rechts: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E, blau: Zellkerne, rot: Zytoplasma), Marscheidenfärbung nach Klüver-Barrera (blau: Myelin), Bielschowsky-Silbernitrat-Färbung (schwarz: Axone, Dendriten und Neurofibrillen), anti-CD3 (braun: T-Zellen), anti-Mac3 (braun: Makrophagen) (A) EphA4^{+/+}, klinischer Score 2,0, ausgeprägte Läsionen, (B) EphA4^{-/-}, Score 0, minimale EAE-Pathologie (C), EphA4^{-/-}, klinischer Score 1,0, intermediäre EAE-Pathologie.

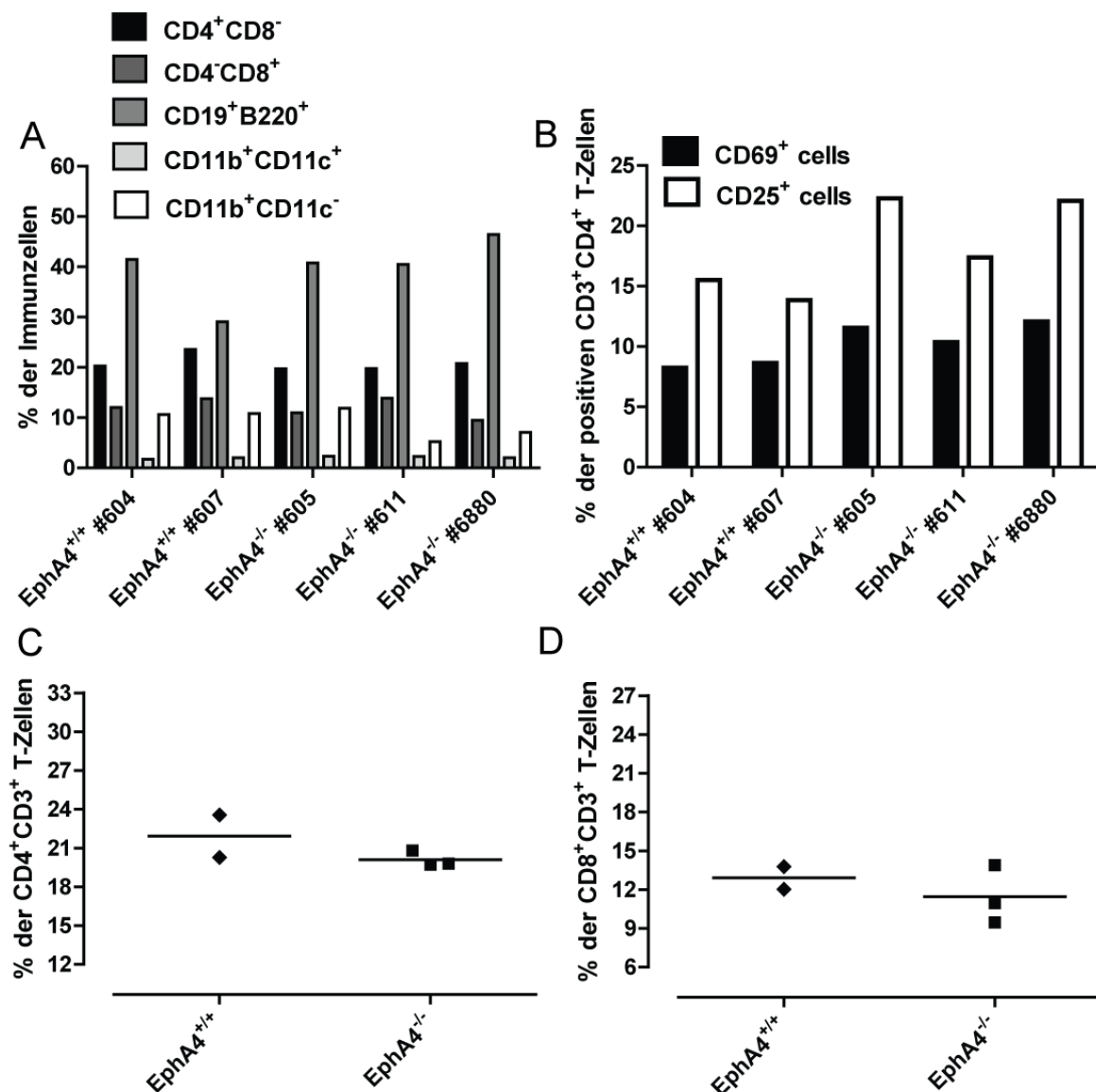
3.2.3 CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, B-Zellen, Dendritische Zellen und Makrophagen sind in EphA4^{-/-}- und EphA4^{+/+}- Mäusen in vergleichbarer Anzahl vorhanden

Mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurde nach Herstellung einer Einzelzellsuspension der Milz mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierter EphA4^{+/+}- und EphA^{-/-}-Mäuse der Anteil verschiedener Immunzellen an der Gesamtzahl aller Immunzellen analysiert und miteinander verglichen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 12A.

Hierbei zeigte sich kein Unterschied in der relativen Anzahl von CD4⁺CD8⁻-, CD4⁻CD8⁺-, CD19⁺B220⁺-, CD11b⁺CD11c⁻- und CD11b⁺CD11c⁻-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl aller Immunzellen zwischen EphA^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäusen. CD3⁺CD4⁺-T-Helferzellen wurden zudem bezüglich ihres Aktivierungsstatus anhand der Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 verglichen. Auch hier zeigte sich kein Unterschied (Abb. 12B). Der Anteil peripherer CD4⁺-T-Helferzellen belief sich

bei den EphA4^{+/+}-Mäusen auf 21,9%, und bei den EphA4^{-/-}-Mäusen auf 20,1% (Abb. 12C), der Anteil peripherer CD8⁺-zytotoxischer T-Zellen auf 12,9% beziehungsweise 11,4% (Abb. 12D), der Anteil CD19⁺B220⁺-B-Zellen auf 25,3% beziehungsweise 42,6% (Abb. 12E), der Anteil CD11c⁺-Dendritischer Zellen auf 1,9% beziehungsweise 2,2% (Abb. 12F) und jener der CD11b⁺-Makrophagen auf 10,7% beziehungsweise 8,1% (Abb. 12G).

Zusammenfassend ließ sich bei der Verteilung der Immunzellen auf verschiedene Kompartimente kein signifikanter Unterschied zwischen EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäusen feststellen.



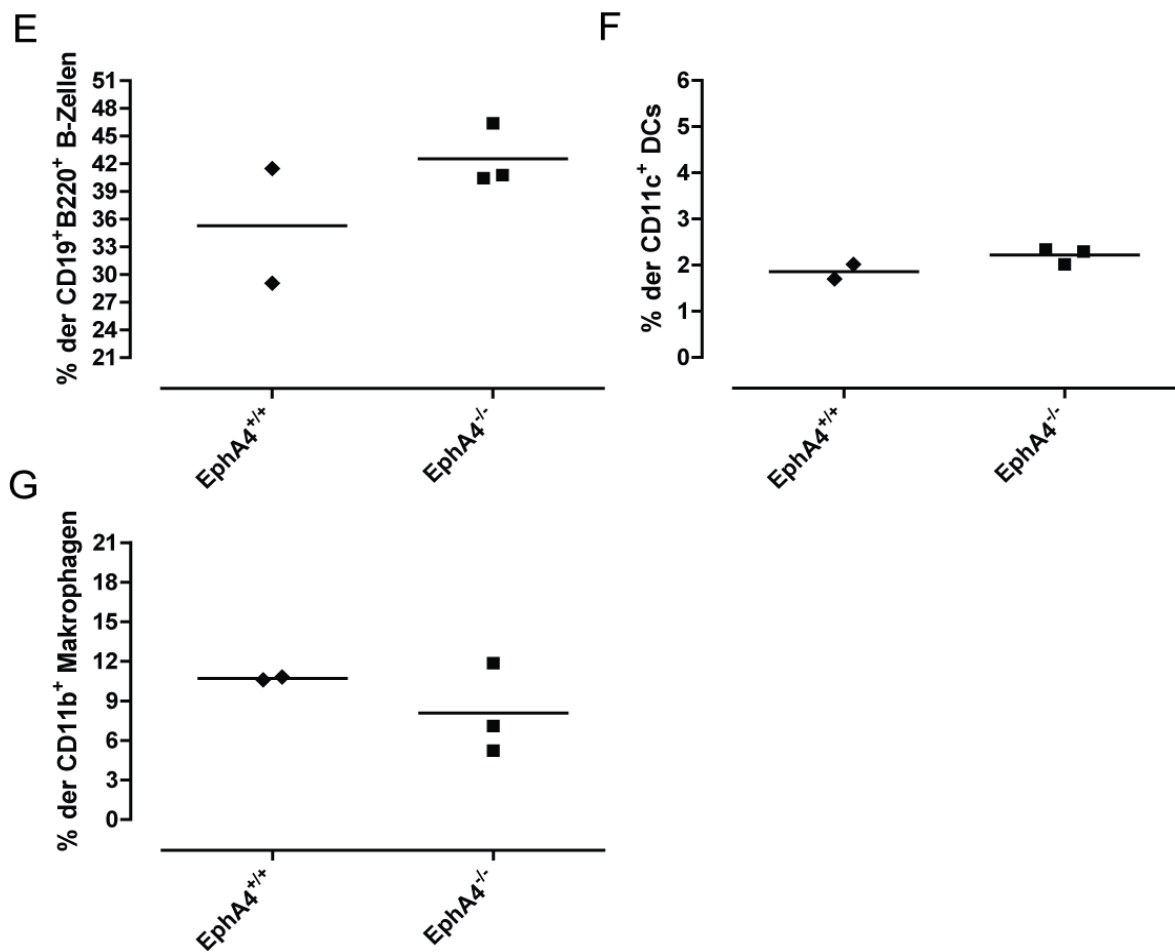


Abb. 12: Der relative Anteil einzelner Immunzellklassen an der Gesamtzahl der Immunzellen (Milz) zeigt in EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäusen keine signifikanten Unterschiede. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert (Linie) sowie die Einzelwerte. (A) Anteil der verschiedenen Immunzellklassen an der Gesamtzahl der Immunzellen (zusammenfassend und nach den einzelnen Versuchstieren aufgeschlüsselt dargestellt), (B) Aktivierungsstatus der CD4⁺-T-Zellen anhand der Aktivierungsmarker CD25 und CD69. Relativer Anteil der CD4⁺-T-Zellen (C), der CD8⁺-T-Zellen (D), der Dendritischen Zellen (E) und der Makrophagen (F) an der Gesamtzahl der Immunzellen (Milz).

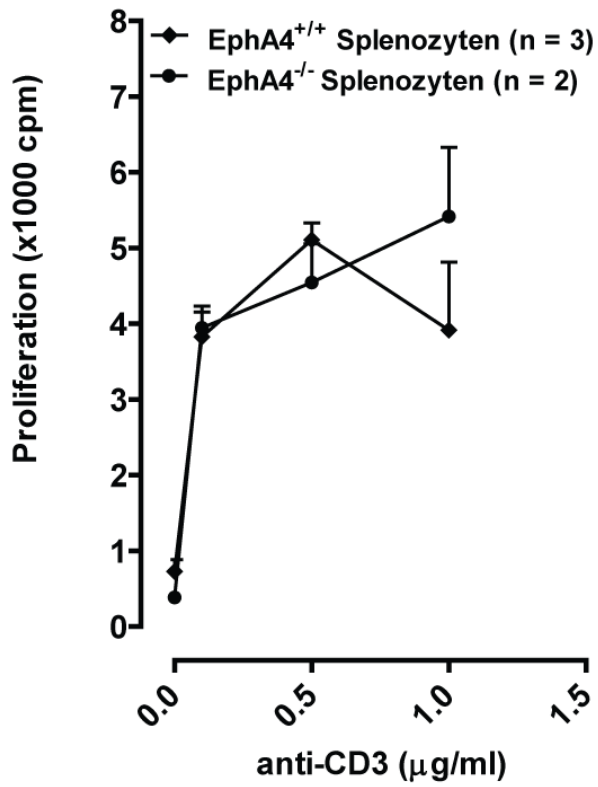
3.2.4 EphA4 beeinflusst die Proliferation der Immunzellen nicht

Splenozyten, die aus der Milz naiver, das heißt nicht-immunisierter, EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}- Mäuse isoliert wurden, wurden *in vitro* mit Concanavalin A (ConA) – ein Mitogen, welches zur Proliferation von B- und T-Zellen führt - und LPS (Daten nicht dargestellt) sowie mit anti-CD3 und anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Die Proliferation von T-Zellen nach Stimulation mit antiCD3 alleine erfolgt in Abhängigkeit professionell Antigen-präsentierender Zellen, während diese bei der Stimulation mit anti-CD3 in Kombination mit anti-CD28 entbehrlich sind. Anschließend wurde die Proliferation mittels ³H-Thymidin Aufnahme quantifiziert und verglichen. Nach der

Stimulation mit anti-CD3 sowie mit anti-CD3/anti-CD28 zeigte sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des Stimulus eine zunehmende Proliferation der Splenozyten. Weder nach der Stimulation mit anti-CD3 in verschiedenen Konzentrationen (Abb. 13A) noch nach der Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 (Abb. 13B) zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Splenozyten.

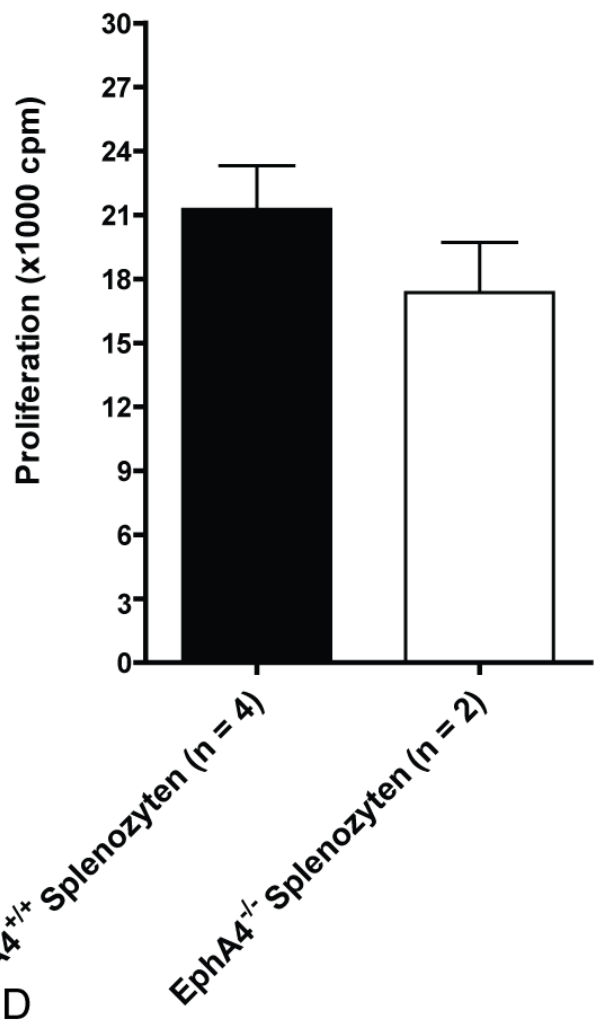
Splenozyten sowie Immunzellen aus peripheren drainierenden Lymphknoten von mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierten Mäusen wurden *in vitro* stimuliert und die daraufhin stattfindende Proliferation miteinander verglichen. Nach der *in vitro* Stimulation der kultivierten Splenozyten und Immunzellen mit rMOG (Daten nicht dargestellt) oder MOG₃₅₋₅₅ in verschiedenen Konzentrationen beobachtete man sowohl bei EphA4^{+/+}- als auch bei EphA4^{-/-}-Splenozyten (Abb. 13C) und Immunzellen drainierender Lymphknoten (Abb. 13D) wie erwartet eine zunehmende Proliferation als Reaktion auf das spezifische Antigen. Zwischen den Gruppen selbst ließ sich kein signifikanter Unterschied beobachten. Splenozyten, die *in vitro* mittels Ovalbumin (Ova₃₂₃₋₃₃₉ oder gesamtes Ovalbumin) stimuliert wurden, zeigten im Gegensatz dazu keine Reaktion auf das unspezifische Antigen. Auch hier ließ sich kein Unterschied zwischen den Gruppen beobachten (Daten nicht dargestellt). Die als Reaktion auf den *in vitro* Stimulus anti-CD3 stattfindende Proliferation von T-Zellen drainierender Lymphknoten, ergab keinen Unterschied zwischen EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Tieren (Abb. 13E). Ebenso ergab sich kein Unterschied in der Proliferation der T-Zellen nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 (Abb. 13F).

A

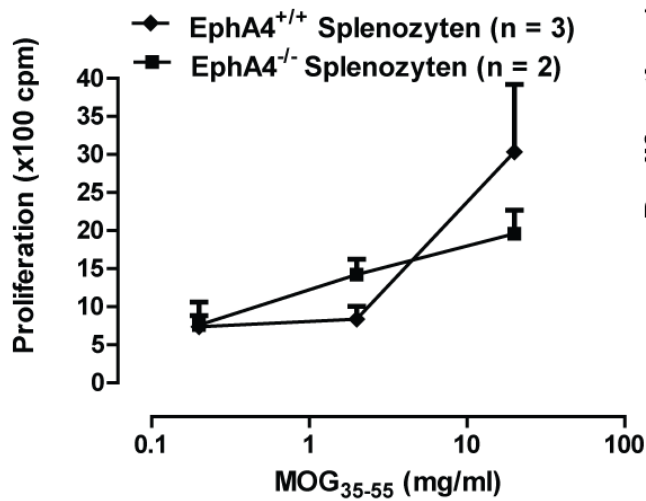


B

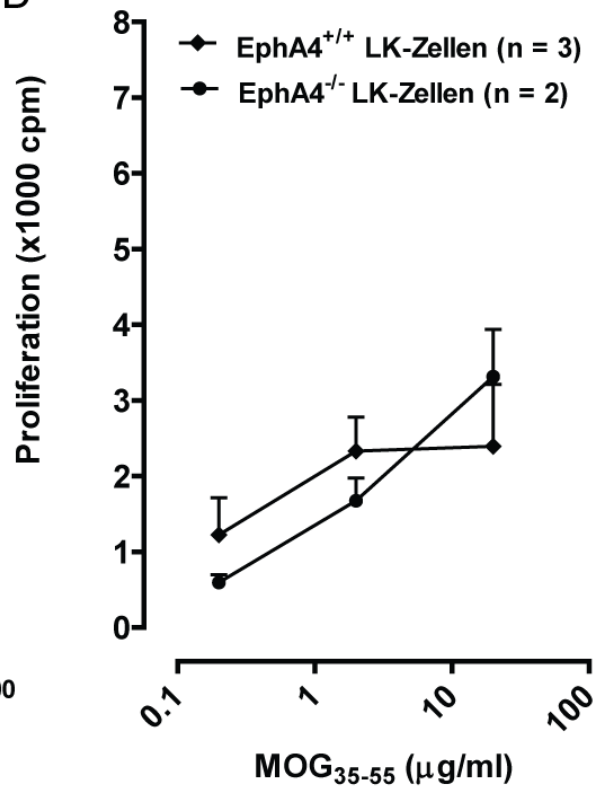
anti-CD3 / anti-CD28



C



D



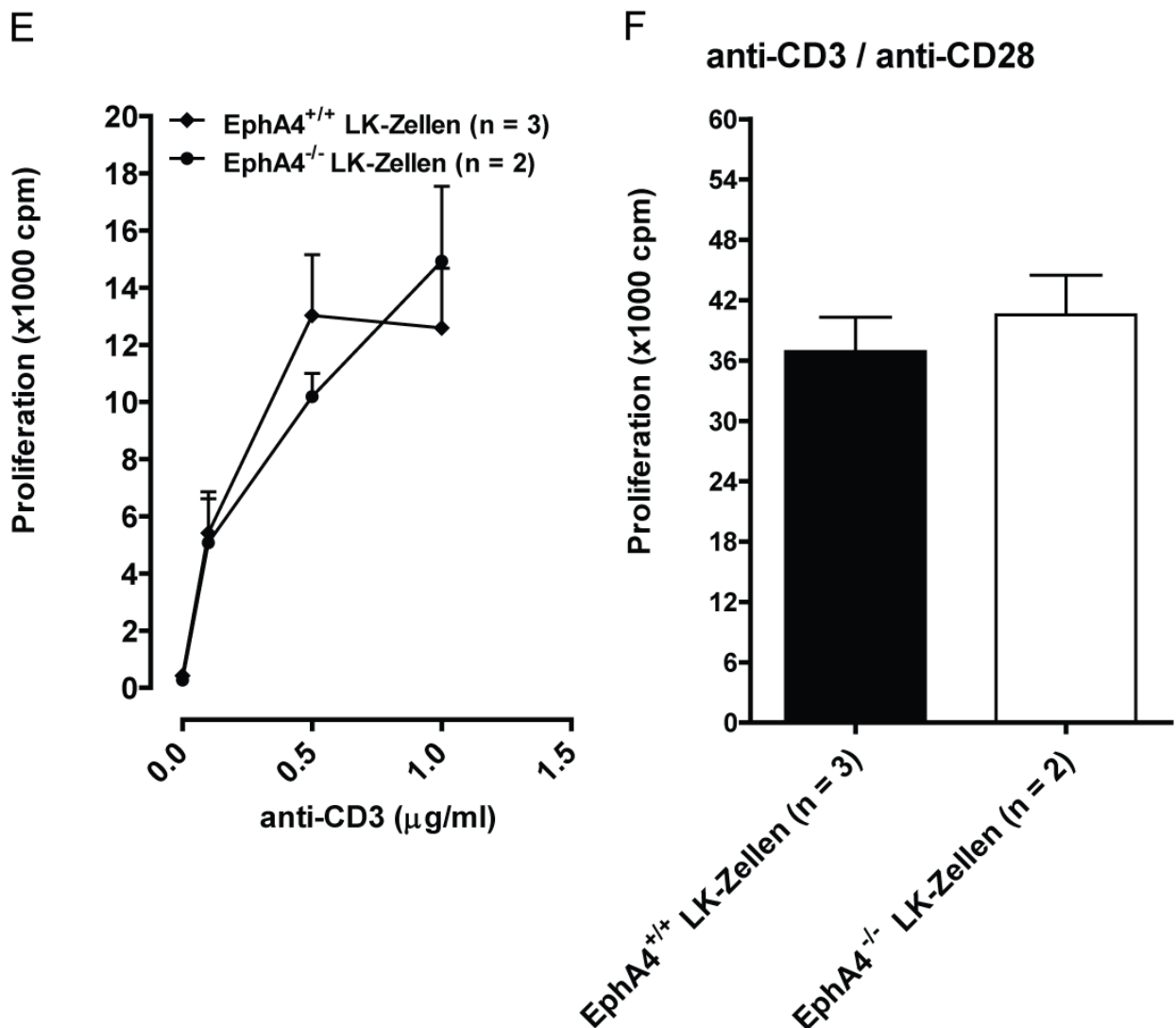


Abb. 13: Immunzellen immunisierter und naiver EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäuse proliferieren auf einen adäquaten Stimulus gleich stark. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Proliferation naiver Splenozyten nach Stimulation mit anti-CD3 (A) und anti-CD3/anti-CD28 (B). Proliferation von Splenozyten aus immunisierten Mäusen nach Stimulation mit MOG₃₅₋₅₅ (C). Proliferation von Immunzellen aus drainierenden Lymphknoten immunisierter Mäuse nach Stimulation mit MOG₃₅₋₅₅ (D), anti-CD3 (E) und anti-CD3/anti-CD28 (F), cpm: *counts per minute* (Zähler pro Minute).

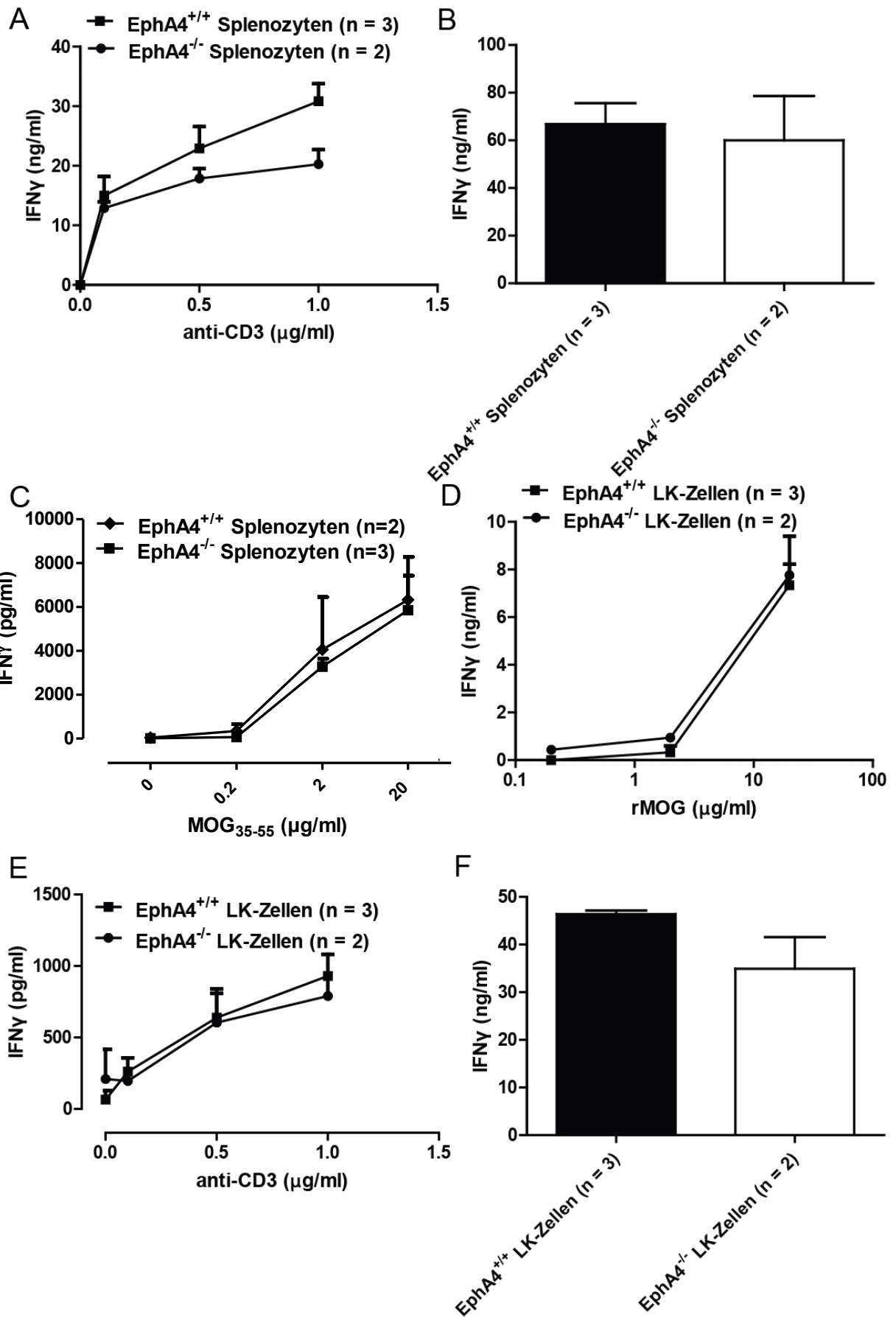
3.2.5 EphA4 hat keinen Einfluss auf die Sekretion von IFN γ und IL-10

Aus der Milz naiver EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäuse wurden Splenozyten isoliert und mit ConA, LPS (Daten nicht dargestellt), anti-CD3 und anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Die daraufhin sezernierten Mengen an IFN γ wurden mittels ELISA quantifiziert. In Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration von anti-CD3 (0,1 bis 1,0 µg/ml) sezernierten die EphA4^{+/+}-Splenozyten 15,0 bis 30,8 ng/ml, die EphA4^{-/-}-Splenozyten

12,9 bis 20,2 ng/ml in den Überstand Abb. 14A). EphA4^{+/+}-Splenozyten sezernierten nach Stimulation mit anti-CD3/CD-28 im Mittel 66,9 ng/ml IFN γ , EphA4^{-/-}-Splenozyten 60,0 ng/ml (Abb. 14B). Es ließ sich jeweils kein Unterschied zwischen EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Splenozyten feststellen.

Splenozyten aus der Milz und Immunzellen aus drainierenden Lymphknoten immunisierter EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäuse wurden mit rMOG und MOG₃₅₋₅₅ *in vitro* stimuliert. Je nach eingesetzter Konzentration des eingesetzten Stimulus (0,2 bis 20 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅) sezernierten die EphA4^{+/+}-Splenozyten 41 bis 6326 pg/ml und die EphA4^{-/-}-Splenozyten 13 bis 5856 pg/ml IFN γ in den Überstand (Abb. 14C). Il-2, -4 und -5 waren weder im Überstand der EphA4^{+/+}-Zellen noch in jenem der EphA4^{-/-}-Splenozyten detektierbar (Daten nicht dargestellt). Aus drainierenden Lymphknoten der immunisierten Tiere isolierte Zellen wurden mit rMOG, anti-CD3 und anti-CD3/anti-CD28 stimuliert, worauf die Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des eingesetzten Stimulus detektierbare Mengen an IFN γ in den Zellüberstand sezernierten. Nach Stimulation mit rMOG in einer Konzentration von 0,2 bis 20 μ g/ml sezernierten die EphA4^{+/+}-Immunzellen 0,3 bis 7,4 ng/ml und die EphA4^{-/-}-Immunzellen 0,4 bis 7,8 ng/ml IFN γ in den Überstand (Abb. 14D). Immunzellen drainierender Lymphknoten wurden zudem mit anti-CD3 sowie anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Nach Stimulation mit anti-CD3 in einer Konzentration von 0,2 bis 20 μ g/ml sezernierten die EphA4^{+/+}-Zellen 64 bis 920,5 pg/ml an IFN γ , die EphA4^{-/-}-Zellen 208,6 bis 789,6 pg/ml (Abb. 14E). Nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 konnten wir bei den EphA4^{+/+}-Mäusen eine IFN γ -Konzentration von 16 ng/ml und bei den EphA4^{-/-}-Tieren von 35 ng/ml im Überstand messen (Abb. 14F). Mittels ELISA ergab sich für keines der gemessenen Paare ein signifikanter Unterschied.

Zudem wurden Splenozyten immunisierter Tiere mit MOG₃₅₋₅₅ stimuliert und mittels ELISA die sezernierte Menge an Il-10 bestimmt. In Abhängigkeit von der eingesetzten MOG₃₅₋₅₅-Konzentration (0,2 bis 20 μ g/ml) konnten dabei unterschiedliche Werte bestimmt werden. Bei den EphA4^{+/+}-Mäusen wurden Werte zwischen 5,5 und 12,5 pg/ml, bei den EphA4^{-/-}-Splenozyten zwischen 9,8 und 18,3 pg/ml gemessen (Abb. 14G). Dieser Unterschied war zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant.



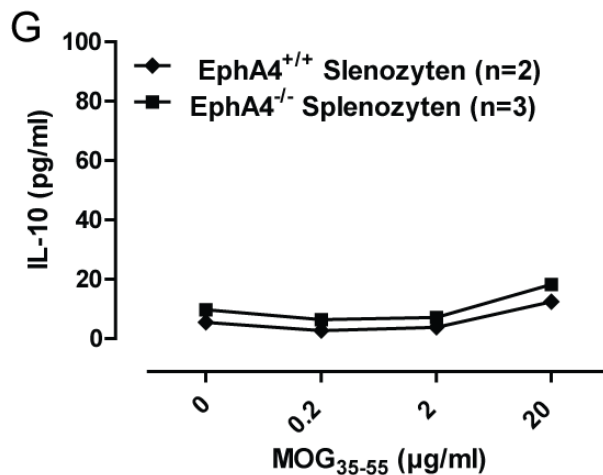


Abb. 14: Nach Stimulation mit einem adäquaten Reiz sezernieren EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäuse äquivalente Mengen an IFN γ und IL-10. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. IFN γ -Sekretion durch naive Splenozyten nach Stimulation mit anti-CD3 (A) und anti-CD3/anti-CD28 (B), durch Splenozyten immunisierter Mäuse nach Stimulation mit MOG₃₅₋₅₅ (C), durch Immunzellen drainierender Lymphknoten immunisierter Mäuse nach Stimulation mit rMOG (D), anti-CD3 (E) und anti-CD3/anti-CD28 (F).

3.2.6 Die humorale Immunantwort ist bei EphA4-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt

Wir haben im Weiteren die humorale Immunantwort der Tiere verglichen. Hierzu wurden mittels ELISA die Titer der spezifischen MOG-Antikörper im Serum immunisierter Mäuse bestimmt. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäusen (Daten nicht dargestellt).

Zudem wurden die Serum-Spiegel der Immunglobuline der Klassen IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 der nicht-immunisierten Tiere bestimmt. Für IgM wurde bei den EphA4^{+/+}-Mäusen ein Serumwert von 230,0 µg/ml und bei den EphA4^{-/-}-Tieren von 142,0 µg/ml bestimmt (Abb. 15A). Für IgG1 ergab sich ein Wert von 15,0 µg/ml beziehungsweise 26,1 µg/ml (Abb. 15B), für IgG2a von 904,3 µg/ml beziehungsweise 1022,0 µg/ml (Abb. 15C), für IgG2b 2196,6 µg/ml beziehungsweise 2227,3 µg/ml (Abb. 15D) und für IgG3 502,3 µg/ml beziehungsweise 240,2 µg/ml (Abb. 15E). Zusammenfassend zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den gemessenen Immunglobulin-Serumwerten zwischen EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäusen. Die für IgG3

gemessenen Werten zeigten dabei die höchsten Werte, jene für IgG2a die niedrigsten.

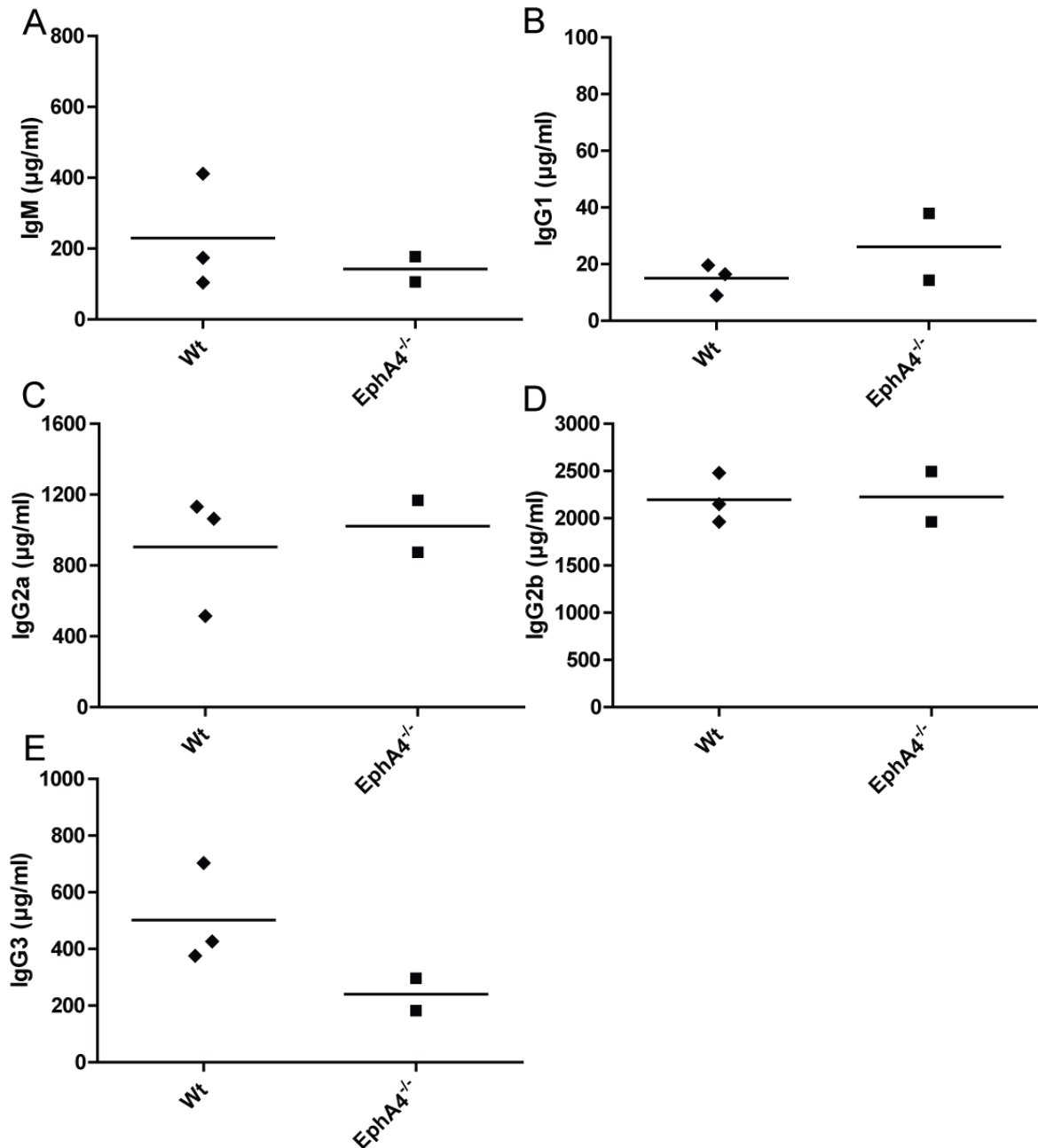


Abb. 15: EphA4^{-/-}-Mäuse weisen keine Defizite in der humoralen Immunantwort auf. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert (Linie) sowie die gemessenen Einzelwerte.

IgM- (A), IgG1- (B), IgG2a- (C), IgG2b- (D) und IgG3-Serumlevel (E) naiver EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Mäuse.

4. Diskussion

4.1 Ephrine und Eph-Rezeptoren sind in MS-Läsionen verstärkt exprimiert

In dieser Arbeit wurde die Expression von Eph-Rezeptoren und Ephrinen in aktiven und inaktiven MS Läsionen quantitativ analysiert. Dabei zeigte sich im Rahmen von LDA-Analysen zusammenfassend ein verändertes Expressionsprofil für Ephrine und deren Rezeptoren in aktiven und inaktiven MS Läsionen, jeweils im Vergleich zur weißen Substanz von Kontrollgewebe. In aktiven MS-Läsionen wurden im Vergleich zur weißen Substanz von Kontrollgewebe vor allem *EFNA3*, *EFNA4*, *EFNB1*, *EPHA1*, *EPHA2*, *EPHA3*, *EPHA8* und *EPHB6* vermehrt exprimiert. In inaktiven Läsionen zeigte sich eine vermehrte Expression für *EFNA3*, *EFNA4*, *EFNA5*, für alle Ephrine der Gruppe B, für alle Eph-Rezeptoren der Gruppe A mit Ausnahme von *EPHA1*, *EPHA8* und *EPHA9* wie auch für alle Eph-Rezeptoren der Gruppe B mit Ausnahme von *EPHB2*.

Die bisher einzige Publikation, die sich mit dem Ephrin/Eph-System im Zusammenhang mit der MS beschäftigt, stammt von Sobel. Dieser berichtet unter der Verwendung immunhistochemischer Daten, dass in aktiven Läsionen perivaskuläre mononukleäre Zellen, am ehesten Lymphozyten, vor allem *EFNA1-3*, *EPHA1*, *A3* und *A4*, reaktive Astrozyten vor allem *EFNA1-3*, *EPH-4*, *-7* und *-8* exprimieren. Zudem wurde eine vermehrte Expression von *EFNA1*, *EPHA3*, *-A4* und *-A7* auf Axonen in und in der Umgebung von MS-Läsionen berichtet (Sobel 2005). Passend hierzu gelang uns im Rahmen von LDA-Analysen der Nachweis einer vermehrten Expression von *EFNA3*, *EPHA1*, *EPHA3* und *EPHA8* in aktiven und von *EFNA3*, *EPHA3*, *EPHA4* und *EPHA7* in inaktiven Läsionen. Ein Nachweis auf dem Proteinlevel gelang nicht.

Zur Klärung der Frage, welche Zellen in MS-Läsionen diese Ephrine und Eph-Rezeptoren exprimierten, wurden Immunfärbungen, *in situ*-Hybridisierung und *in vitro* Untersuchungen von humanen Astrozyten und Immunzellen durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen ergaben für Antikörper, welche gegen dasselbe Ephrin beziehungsweise denselben Eph-Rezeptor gerichtet waren, unterschiedliche Muster, sodass die Interpretation der Immunfärbungen schwierig blieb. Die Etablierung der *in situ*-Hybridisierung scheiterte.

In vitro-Untersuchungen von humanen Astrozyten zeigten, dass diese vor allem die Eph-Rezeptoren *EPHA2* und *EPHA4* konstitutiv exprimierten. Beide Rezeptoren fanden sich im Rahmen unserer LDA-Analysen auch in aktiven und inaktiven MS-Läsionen.

Des Weiteren untersuchten wir das Expressionsprofil von Ephrinen und Eph-Rezeptoren durch Astrozyten *in vitro* nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen. Wir konnten im Rahmen unserer LDA-Analysen zeigen, dass *EFNA3* und *EPHA2* in aktiven und inaktiven Läsionen vermehrt exprimiert werden. Aktive Läsionen zeichnen sich durch ein inflammatorisches Milieu aus. Hierzu tragen neben eingewanderten Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen auch proinflammatorische Zytokine wie $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ bei (Navikas 1996). Wir konnten nachweisen, dass Astrozyten *in vitro* nach der Stimultion mit den proinflammatorischen Zytokinen $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und IL-1 sowohl *EFNA3* als auch *EPHA2* vermehrt exprimierten. In der Folge könnte postuliert werden, dass es in aktiven MS Läsionen unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine zur vermehrten Expression von *EFNA3* und *EPHA2* auf Astrozyten kommt, was wiederum zu dem von uns gezeigten vermehrten Nachweis in aktiven Läsionen beitragen könnte. Bei $TGF\beta$ handelt es sich um ein antiinflammatorisches Zytokin, dessen Expressionsniveau bei MS Patienten negativ mit der Krankheitsschwere korreliert. Eine vermehrte Expression beobachtet man vor allem bei Patienten, welche einen stabilen Krankheitsverlauf aufweisen, eine verminderte Expression dagegen bei Patienten im Schub (Navikas 1996). Corline *et al.* konnten bereits 1999 zeigen, dass in aktiven Läsionen $TGF\beta$ durch Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten exprimiert wird, in inaktiven Läsionen erfolgt die Expression durch Astrozyten (*de Groot et al.* 1999). Nach der Stimulation von Astrozyten *in vitro* mit $TGF\beta$ beobachteten wir eine vermehrte Expression von *EFNA3* und *EPHA2*. Diese könnte zu dem vermehrten Nachweis in aktiven und vor allem auch inaktiven Läsionen beitragen.

EFNB3 und *EPHA4* werden in aktiven Läsionen im Vergleich zu der weißen Substanz von Kontrollgewebe nur geringfügig mehr exprimiert. In inaktiven Läsionen dagegen zeigte sich eine auf das 26-fache gesteigerte Expression von *EFNB3* und eine auf das 10-fache gesteigerte Expression von *EPHA4*. In unseren *in vitro*-Analysen zeigte sich für *EFNB3* und *EPHA4* nach der Stimulation von Astrozyten mit proinflammatorischen Zytokinen eine nahezu konstante beziehungsweise verminderte

Expression. Jedoch konnten wir zeigen, dass Monozyten *ex vivo* nach der Stimulation mit $TNF\alpha$ eine vermehrte *EFNB3*-Expression zeigen, welche zum vermehrten *EFNB3*-Nachweis in aktiven MS Läsionen beitragen könnte. Nach der Stimulation von kultivierten Astrozyten mit dem antiinflammatorischen Zytokin $TGF\beta$ konnte eine geringe Steigerung der *EPHA4*-Expression beobachtet werden, welche somit zum vermehrten Nachweis in aktiven, insbesondere aber auch in inkativen Läsionen, passen würde. Eine Erklärung für die stark erhöhte Expression von *EFNB3* in inaktiven Läsionen fand sich in der vorliegenden Arbeit nicht.

EPHB6 wird in aktiven Läsionen vermehrt exprimiert. Nach der Stimulation kultivierter Astrozyten *in vitro* mit pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zeigte sich jedoch eine verminderte bis allenfalls diskret vermehrte Expression von *EPHB6*. Folglich kann postuliert werden, dass die vermehrte Expression von *EPHB6* in aktiven Läsionen nach den vorliegenden Daten dieser Arbeit nicht auf eine vermehrte Expression durch Astrozyten zurückzuführen ist.

4.2 EphA4 fördert die astrozytäre Gliose und hemmt die Regeneration im ZNS

Goldshmit *et al.* untersuchten die Regeneration EphA4-defizienter Mäuse nach einer halbseitigen Durchtrennung des lumbalen Rückenmarks: drei bis vier Wochen nach dem gesetzten Trauma war die Regeneration der Axone in EphA4-defizienten Mäusen signifikant weiter vorangeschritten als in Kontrollen, die Astrogliose/Narbenbildung war geringer ausgeprägt und auch klinisch zeigten die EphA4^{-/-}-Mäuse ein funktionell besseres *Outcome* als die EphA4^{+/+}-Mäuse. Zudem konnte im Rahmen von *in vitro*-Analysen gezeigt werden, dass EphA4 sowohl auf Astrozyten als auch in einem geringeren Ausmaß auf Neuronen einen negativen Effekt auf das Wachstum von Neuriten hat. Auch wir konnten zeigen, dass Astrozyten *in vitro* konstitutiv *EPHA4* exprimieren. $IFN\gamma$ und LIF (*Leukemia inhibitory factor*) führten zudem zu einer vermehrten Expression von EphA4 auf Astrozyten (Goldshmit et al. 2004), so dass zusammenfassend ein entzündetes Milieu unter dem Einfluss bestimmter Zytokine im Zusammenspiel mit EphA4 zu einer verminderten axonalen Regeneration führt und die Ausbildung einer glialen Narbe fördert. Die vermehrte Expression von *EPHA4* durch Astrozyten nach Stimulation mit

IFN γ konnten wir in unseren *in vitro*-Versuchen nicht bestätigen. Fabes *et al.* injizierten Ratten mit einer Verletzung des Rückenmarks das EphA4-blockierende Peptid KYLPYWPVLSSL (Murai *et al.* 2003). Jene Tiere, die dieses Peptid innerhalb eines bestimmten Zeitraums nach der Verletzung intrathekal appliziert bekamen, zeigten ein vermehrtes Einsprossen neuer Axone sowie von Astrozyten im Bereich der Läsion und in der Folge ein besseres funktionelles *Outcome* als die Kontrollen (Fabes *et al.* 2007).

4.3 EPHB6 wird in MS Läsionen vermehrt exprimiert

Wir konnten zeigen, dass *EPHB6* in aktiven sowie in inaktiven Läsionen vermehrt exprimiert wird. Der Eph-Rezeptor B6 wird sowohl auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen als auch auf B-Zellen und Monozyten sowie Makrophagen exprimiert. Die Aktivierung von T-Zellen führt zu einer verminderten Expression des Rezeptors auf deren Oberfläche (Luo *et al.* 2002). Diese Befunde konnten wir in der vorliegenden Arbeit bestätigen, indem wir zeigen konnten, dass vor allem T-Zellen *ex vivo*, aber auch Monozyten *ex vivo*, *EPHB6* exprimieren. Nach Stimulation mit Ionomycin in Kombination mit PMA beobachteten wir ebenfalls eine verminderte Expression von *EPHB6* auf T-Zellen. Die Stimulation von T-Zellen *in vitro* mit anti-CD3 und anti-EphB6 führt zu einer ausgeprägten Proliferation der stimulierten Zellen sowie zu einer vermehrten Expression des Il-2-Rezeptors CD25, dem Adhäsionsmolekül CD54 und dem T-Zell-Aktivator-Marker CD69 und zur vermehrten Sekretion von IFN γ , TGF β , TNF α , GM-CSF, Il-10 und Il-6. Als möglicher physiologischer Aktivator des EphB6-Rezeptors gilt Ephrin-B2 (Luo *et al.* 2002). Somit könnte eine wie von uns beschriebene vermehrte Expression von *EPHB6* in aktiven sowie in chronisch, demyelinisierten MS-Läsionen zur Entstehung und Aufrechterhaltung eines proinflammatorischen Mikromilieus im ZNS von MS-Patienten führen.

4.4 Immunzellen exprimieren Ephrine und Eph-Rezeptoren

In der aktuellen Literatur ist beschrieben, dass T-Zellen sowohl Eph-Rezeptoren der A-Gruppe (EphA1, A4) als auch Ephrine der Gruppe A (Ephrin-A1, -2 und -4) exprimieren (Aasheim *et al.* 2005b). Die konstitutive Expression von EPHA4 durch T-Lymphozyten konnten wir in unseren *in vitro*-Analysen bestätigen. T-Lymphozyten

rezirkulieren zwischen peripherem Blut und Lymphknoten, werden dort über die Interaktion mit diversen Zellen wie professionell Antigen-präsentierenden Zellen, Endothel und anderen Komponenten wie extrazellulären Matrixproteinen und über eine Interaktion mit diesen aktiviert (von Andrian und Mackay 2000). Diese Interaktionen werden vor allem über Integrine auf der Oberfläche der T-Lymphozyten vermittelt. In der Folge kommt es zur Extravasation in das umgebende Gewebe oder in Lymphknoten beziehungsweise in andere sekundär lymphatische Organe (von Andrian und Mackay 2000). Während die Stimulation von Ephrinen der Gruppe A auf T-Lymphozyten zu einer vermehrten Bindung an extrazelluläre Matrixproteine und andere Zellen via β 1- und β 2-Integrinen führt, hat die Aktivierung der EphA-Rezeptoren auf T-Zellen anti-adhäsive Effekte zur Folge (Sharfe et al. 2008). Zudem führt die Stimulation von EphA-Rezeptoren, insbesondere von EphA4 zu einer vermehrten Migration von T-Zellen (Holen et al. 2010). $CD4^+$ -T-Zellen exprimieren den Eph-Rezeptor A4. Ephrin-A1, ein Ligand des EphA4-Rezeptors, wird *in vivo* auf hochendothelialen Venolen exprimiert und fördert unter anderem im Zusammenspiel mit Eph-Rezeptoren auf Immunzellen die Chemotaxis sowie die transendotheliale Migration dieser (Aasheim et al. 2005a). Die von Sobel beschriebene vermehrte Expression von EphA-Rezeptoren und Ephrinen der Gruppe A auf perivaskulären mononuklearen Zellen in aktiven Läsionen (Sobel 2005) sowie die von uns beschriebene Expression von Ephrinen der Gruppe A und deren Rezeptoren in MS-Läsionen sowie auf T-Zellen könnte bei der Migration von aktivierten peripheren Immunzellen ins ZNS und unter anderem bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke eine Rolle spielen.

Zudem exprimieren humane dendritische Zellen sowie B-Zellen diverse Eph-Rezeptoren und Ephrine. Dendritische Zellen exprimieren vor allem die Eph-Rezeptoren A2, -4, -7 sowie B1 und -3 (de Saint-Vis et al. 2003). Periphere B-Zellen exprimieren vor allem den Eph-Rezeptor A4 und Ephrin-A4. Die Stimulation der Zellen *in vitro* mit anti-IgM oder LPS führt zur Aktivierung der Zellen und einem veränderten Ephrin/Eph-Expressionsmuster. Nach Aktivierung exprimieren die B-Zellen unter anderem vermehrt den Eph-Rezeptor B6 (Alonso-C et al. 2009), welches wir im Rahmen unserer Experimente auch vermehrt in aktiven und chronisch demyelinisierten Läsionen finden konnten.

4.5 Kritische Betrachtung der Immunisierungsversuche

Ein Einfluss von Eph-Rezeptoren auf die EAE wurden erstmals durch Hongyu Luo *et al.* 2004 beschrieben: EphB6-defiziente Mäuse entwickelten eine geringere EAE nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ im Vergleich zu EphB6^{+/+}-Mäusen, am ehesten aufgrund einer verminderten T-Zell-Funktion in den EphB6-negativen Mäusen (Luo *et al.* 2004).

In unseren ersten Vorversuchen entwickelten EphA4^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu EphA4^{+/+}-Mäusen eine mildere Form der EAE, mit verminderter Inzidenz und Krankheitschwere sowie einer späteren Manifestation der EAE.. In einem ersten Vorversuch war dabei der beobachtete Unterschied zwischen EphA^{-/-}- und EphA4^{+/+}-Mäusen, insbesondere bezüglich des maximal erreichten durchschnittlichen klinischen Scores, also der Krankheitschwere, größer als bei einem zweiten Versuch. Jüngst beschrieben auch Munro *et al.* nach Immunisation mit MOG₃₅₋₅₅ eine signifikant verminderte Krankheitschwere, insbesondere einen geringeren maximal erreichten durchschnittlichen klinischen Score, wie auch eine signifikant spätere Manifestation der EAE bei EphA^{-/-} im Vergleich zu EphA4^{+/+}-Mäusen mit dem genetischen Hintergrund C57/Bl6. Munro *et al.* gingen noch einen Schritt weiter und injizierten immunisierten EphA4^{+/+}-Mäusen EphA4-Fc, welches EphA4 blockt. Daraufhin beobachtete die Gruppe um Munro eine signifikant spätere Manifestation der EAE im Vergleich zu Kontrollen; im weiteren Verlauf der EAE zeigte sich jedoch kein Unterschied. Wie auch von uns gezeigt, konnten histologisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen bezüglich der T-Zell- und Makrophagen-Infiltration auf Rückenmarksebene nachgewiesen werden (Munro *et al.* 2013).

Wir stellten uns die Frage, worauf der in den ersten Vorversuchen beobachtete Unterschied in Manifestation und Verlauf der EAE zurückzuführen sein könnte. Da Ephrine und Eph-Rezeptoren auf Immunzellen exprimiert sind, analysierten wir die Integrität des Immunsystems in EphA4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den EphA4^{+/+}-Mäusen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die Anzahl peripherer CD4⁺-, CD8⁺-, B-Zellen, Dendritischer Zellen und Makrophagen. Der Aktivierungsstatus peripherer T-Zellen unterschied sich zwischen den beiden Genotypen nicht. Auch Munoz *et al.* untersuchten EphA4-defiziente Mäuse im Hinblick auf das T-Zell-Kompartiment: Neben einem verkleinerten, hypozellulären

Thymus mit weitreichenden histologischen Veränderungen, insbesondere im Bereich epithelialer Zellen, zeigten die EphA4-defizienten Mäuse eine verminderte Anzahl peripherer CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen im Vergleich mit EphA4^{+/+}-Mäusen (Muñoz et al. 2006). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten mit dem unterschiedlichen Hintergrund der verwendeten Mäuse erklärt werden. Während die von uns verwendeten EphA4-defizienten Mäuse und entsprechend auch die Kontrollen einen C57BL/6xSV129 Hintergrund aufwiesen (Kullander et al. 2001), verwendete die Arbeitsgruppe um Muñoz Mäuse des Hintergrundes C57BL/DBA (Muñoz et al. 2006).

In unseren Versuchen war die Proliferation von Splenozyten naiver und von Immunzellen immunisierter Tiere auf das spezifische Antigen MOG₃₅₋₅₅ zwischen beiden Gruppen vergleichbar. Die Fähigkeit zur Produktion der Zytokine IFN γ und IL-10 durch Immunzellen und die Konzentration von Immunglobulinen im Serum von EphA4^{-/-}- und EphA4^{+/+}-Mäusen zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Munro *et al.* gingen noch einen Schritt weiter: im Rahmen eines adoptiven T-Zell-Transfers konnten diese zeigen, dass EphA4^{-/-}-T-Zellen ebenso wie jene von EphA4^{+/+}-Tieren in der Lage sind eine EAE zu induzieren (Munro et al. 2013). Um den beobachteten Effekt im Verlauf der EAE erklären zu können, bedarf es daher weiterer Untersuchungen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Rolle ZNS-ständiger Zellen, insbesondere von Astrozyten unter anderem im Hinblick auf Gliose und Narbenentstehung, genauer zu analysieren. Auch der Einfluss von EphA4 auf die axonale Regeneration könnte einen Einfluss auf die unterschiedliche Manifestation und den Verlauf der EAE in den beiden Genotypen haben.

In einem weiteren Immunisierungsversuch in unserem Labor konnten die Daten unserer Vorversuche nicht mehr reproduziert werden. Eine mögliche Erklärung könnte der gemischte genetische Hintergrund der von uns verwendeten Mäuse sein. Einige im Rahmen der EAE identifizierte Antigene können bei einigen Tierspezies eine EAE induzieren, während sie bei einer anderen Spezies kein pathogenes Potential haben. Dabei beobachtet man aber nicht nur eine Abhängigkeit von der Spezies selbst, sondern auch vom unterschiedlichen Hintergrund der verwendeten Tiere und damit bereits Unterschiede innerhalb einer Spezies (Krishnamoorthy und Wekerle 2009; Krishnamoorthy et al. 2007). Da es sich bei den von uns verwendeten Mäusen um Tiere mit dem gemischten Hintergrund C57BL/6xSV129 handelte, kam es zwischen den einzelnen Tieren, insbesondere dann, wenn sie nicht von den selben

Bruttieren abstammten, zu leichten Unterschieden bezüglich des Hintergrundes. Dies könnte eine Erklärung für die differenten Beobachtungen in den Immunisierungsversuchen sein. Darüber hinaus spielt nicht nur der genetische Hintergrund der Tiere, sondern auch weitere, zum Teil noch nicht identifizierte Faktoren, eine Rolle. Auch bei den spontanen EAE-Modellen beobachtet man in der Regel keine Inzidenzraten von 100%, das heißt in der Folge, dass auch noch andere Mechanismen, die letztlich zur Manifestation der EAE führen und deren Verlauf und damit die Krankheitsschwere bestimmen, eine Rolle spielen müssen. Zum Teil konnten die unterschiedlichen Inzidenzraten auf unterschiedliche Geschlechter oder aber auch auf die Haltungsbedingungen der Tiere zurückgeführt werden (Pöllinger et al. 2009a; Krishnamoorthy et al. 2006). Insbesondere bezüglich der Haltungsbedingungen gab es in unserem ersten Immunisierungsversuch Unterschiede zum zweiten und dritten Versuch. Dabei wurden die Tiere im ersten Versuch nach Immunisierung in einen Tierstall mit einer niedrigeren Sauberkeitsstufe transferiert.

5. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche und demyelinisierende Erkrankung des ZNS. Die Läsionsentwicklung wird durch multiple Interaktionen zwischen Immunzellinfiltraten und hirneigenen Zellen bestimmt. Ziel dieser Arbeit ist es, Einblick in eine mögliche Rolle des Ephrin/Eph-Systems in der Läsionsentwicklung der MS zu bekommen. Dieses System besteht aus Eph-Rezeptoren, die die größte Familie von Rezeptortyrosinkinasen darstellt und membrangebundenen Ephrin-Liganden. Die Eph/Ephrin-Proteine wurden zunächst als wesentliche Regulatoren der Wegfindung von Axonen in der Entwicklung erkannt; sie werden aber ubiquitär exprimiert und ihre Rolle bei verschiedenen Krankheitsprozessen findet zunehmende Beachtung.

In dieser Arbeit wurden die 14 humanen Eph-Rezeptoren und die acht humanen Ephrine mit quantitativer PCR in dissoziierten aktiven und inaktiven MS Läsionen aus Autopsiegewebe quantifiziert. Dabei zeigte sich ein signifikant unterschiedliches Expressionsmuster von Ephrinen und Eph-Rezeptoren auf dem RNA-Level in aktiven und inaktiven MS-Läsionen im Vergleich zur weißen Substanz von Kontrollen. In aktiven MS-Läsionen wurden im Vergleich zur weißen Substanz von Kontrollgewebe vor allem *EFNA3*, *EFNA4*, *EFNB1*, *EPHA1*, *EPHA2*, *EPHA3*, *EPHA8* und *EPHB6* vermehrt exprimiert. Dabei waren die beobachteten Werte für *EFNA4*, *EFNB1* und *EPHA2* nach Korrektur für multiples Testen aller 516 auf den TLDA gemessenen Gene auf einem Signifikanzniveau von 0,05 statistisch signifikant. In inaktiven Läsionen zeigte sich eine vermehrte Expression für *EFNA3*, *EFNA4*, *EFNA5*, für alle Ephrine der Gruppe B, für alle Eph-Rezeptoren der Gruppe A mit Ausnahme von *EPHA1*, *EPHA8* und *EPHA9* wie auch für alle Eph-Rezeptoren der Gruppe B mit Ausnahme von *EPHB21*, dabei erwies sich der Wert für *EFNB3* als statistisch signifikant.

Anschließend sollte mit *in situ*-Hybridisierung, Immunhistochemie und Untersuchung von *in vitro* kultivierten humanen Astrozyten, Monozyten und T-Zellen *ex vivo* untersucht werden, welche Mitglieder des Ephrin/Eph-Systems in welchen Zelltypen exprimiert werden. Dabei zeigte sich, dass humane primäre Astrozyten, T-Zellen und Monozyten *ex vivo* Eph-Rezeptoren und Ephrine exprimierten. Naive primäre

Astrozyten exprimierten konstitutiv vor allem *EPHA2* und *EPHA4*. T-Zellen und Monozyten exprimieren *ex vivo* vor allem *EPHA4* und *EPHB6* konstitutiv.

Weiter konnte durch *in vitro* Experimente mit humanen Astrozyten Einblick in die Regulation von Eph/Ephrin-Proteine gefunden werden: Nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und $\text{TGF}\beta$ *in vitro* kam es zu einer vermehrten Expression von *EFNA3* und *EPHA2*, welche auch in MS Läsionen vermehrt exprimiert werden. Nach der Stimulation mit $\text{TGF}\beta$ zeigte sich eine vermehrte Expression von *EPHA4*, welches sich in inaktiven MS Läsionen vermehrt findet.

Schließlich wurde in einem Tiermodell der MS, der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), untersucht, ob EphA4 einen Einfluss auf eine autoimmune Enzephalomyelitis hat. Hierzu wurde in EphA4 defizienten Mäusen eine EAE durch Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ induziert. Während in einer ersten Versuchsreihe EphA4^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu EphA4^{+/+}-Mäusen nach Immunisierung einen milderen Verlauf hatten, wurde in einem weiteren Versuch kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen nachgewiesen. Mögliche Gründe hierfür können der gemischte genetische Hintergrund der Tiere oder auch unterschiedliche Haltungsbedingungen sein. EphA4^{+/+}- und EphA4^{-/-}-Tiere zeigten unabhängig vom Genotyp eine typische EAE-Pathologie. Eine positive Korrelation fand sich zwischen Schweregrad der EAE und histologischem Ausmaß von Entzündung, Demyelinisierung und axonalem Schaden. *In vitro* Untersuchungen zu zellulären und humoralen Immunreaktionen ergaben keine Unterschiede zwischen EphA4^{-/-}- und Wildtypmäusen.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit durch quantitative Analyse veränderte Eph/Ephrin Expressionen in MS Läsionen nachweisen, insbesondere eine Induktion von EphA4 in chronisch inaktiven Läsionen. *In vitro* wird EphA4 in Astrozyten durch $\text{TGF}\beta$ induziert. Weitere funktionelle Experimente sind erforderlich, um die Rolle einzelner Eph/Ephrine in der Entwicklung von autoimmunen ZNS Läsionen zu klären.

6. Abkürzungen

Ab	Antikörper (<i>Antibody</i>)
ABTS	2,2'-Azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic Säure
AF-6	<i>ALL1-fused gene from chromosome 6 protein</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
Arg	<i>Abl related gene</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3'-indoly-Phosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNS (<i>complementary DNA</i>)
CFA	Komplettes Freund's Adjuvant
CLEC16A	<i>C-type lectin domain family 16</i>
CNPase	<i>2', 3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase</i>
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic Factor</i>
CO ₂	Kohlendioxid
ConA	Concanavalin A
Cpm	Zähler pro Minute (<i>counts per minute</i>)
cRNS/RNA	Komplementäre RNS (<i>complementary RNA</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDSS	<i>Expanded Disability Scale</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
Efn/EFN	Ephrin
ELISA	<i>Enzym-linked Immunosorbent Assay</i>
Eph/EPH	Eph-Rezeptor
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Flourescence Activated Cell Sorting</i>)

FBS	Fetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calb serum</i>)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
Fyn	<i>ADAB, Adhesion and Degranulation promoting Adaptor Protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Saures Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GIP	Glycosylphosphatidylinositol
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
Grb	<i>Growth Factor Receptor-bound Protein</i>
Grip	<i>Glutamate receptor interacting protein</i>
gt	Ziege (<i>goat</i>)
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H ₂ O	Wasser
HBSS	<i>Hank`s buffered salt solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfon-Säure
HFF	Humane Vorhautfibroblasten (<i>human foreskin fibroblasts</i>)
HLA	Humanes Leukozytenantigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HNPP	2-Hydroxy-3-naphtoic acid-2'-phenylanilide Phosphat
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hu-vWF	Humaner von Willebrand Faktor
ICF	Inkomplettes Freund's Adjuvant
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL2RA	<i>Interleukin 2 receptor alpha</i>
IL7RA	<i>Interleukin 7 receptor alpha</i>
IL-6st	<i>Interleukin 6 signal Transducer</i>
Iono	Ionomycin
IRF8	<i>Interferon regulatory factor 8</i>
ISH	In situ-Hybridisierung
Ko	<i>Knockout</i>
LDA	<i>Low density array</i>

LIF	<i>Leukemia inhibitory Factor</i>
LK	Lymphknoten
LMW-PTP	<i>Low molecular weight protein tyrosine phosphatase</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT α	Lymphotoxin α
LTD	Langzeit-Depression (<i>long-term depression</i>)
LTP	Langzeit-Potenzierung (<i>long-term potentiation</i>)
MACS	Magnetische Zellseparation (<i>magnetic cell separation</i>)
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Basisches Myelinprotein (<i>Myelin basic protein</i>)
MHC	Hauptkompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MOBP	Basisches Myelin assoziiertes Oligodendrozyten-Protein (<i>Myelin-associated oligodendrocyte basic Protein</i>)
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (<i>Myelin-Oligodendrocyte-Glycoprotein</i>)
MPI	Max-Planck-Institut
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
ms	Maus (<i>mouse</i>)
NBPF1	<i>Neuroblastoma Breakpoint Family member 1</i>
NBT	<i>Nitro-blue tetrazolium</i>
Nck	<i>Non-catalytic region of tyrosine-kinase Adaptor Protein</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
Nogo-A	Nerven wachstumshemmender Faktor A (<i>Neurite outgrowth inhibitor A</i>)
NTMT	<i>Alkaline phosphatase buffer</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte (<i>optical density</i>)
OKB	Oligoklonale Banden
O/N	Über Nacht (<i>over night</i>)
OSM	Oncostatin M
OSP	Oligodendrozyten-spezifisches Protein (<i>Oligodendrocyte-specific protein</i>)
Ova	Ovalbumin

PAF	Paraformaldehyd
PAK2	<i>p21 activated Kinase</i>
PAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PBT	Polybutylenterephthalat
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDZ-RGS	<i>Regulator of G-Protein Signaling 3 isoform</i>
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin Streptomycin
PerCP-Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein
PFA	Paraformaldehyd
Pick	<i>PRKCA-binding protein</i>
PLP	Myelinisches Proteolipidprotein
PP-MS	Primär progrediente MS
P58-P13K	p58 Untereinheit der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)
PTP-BL	<i>Protein tyrosine phosphatase BAS-like</i>
RasGAP	Ras GTPase aktivierendes Protein (<i>Ras GTPase activating Protein</i>)
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>real quantitative PCR</i>)
rb	Kaninchen (<i>Rabbit</i>)
rMOG	Rekombinantes MOG
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RR-MS	<i>Relapsing-Remitting MS</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>Sterile alpha motif</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SHEP1	<i>SH2 domain-containing Eph receptor-binding protein 1</i>
SLAP	<i>Src-like adaptor protein</i>
SP-MS	Sekundär progrediente MS
SSC	<i>Saline sodium citrate</i>

TCR	T-Zell Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor (<i>tumor necrosis factor</i>)
TNFRSF1A	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A</i>
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure (<i>transfer ribonucleic acid</i>)
UNG	<i>Uracil DNA Glycosidase</i>
Wt	<i>Wildtype</i>
Yes	<i>Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i>
ZBTB20	<i>Zinc finger and BTB domain-containing Protein 20</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Allgemein: humane Gene in der vorliegenden Arbeit groß und *kursiv*, murine Gene klein und *kursiv*, Proteine jeweils nicht *kursiv*.

7. Literatur

- Aasheim, H. C.; Munthe, E.; Funderud, S.; Smeland, E. B.; Beiske, K.; Logtenberg, T. (2000): A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes. In: *Blood* 95 (1), S. 221–230.
- Aasheim, Hans-Christian; Delabie, Jan; Finne, Eivind Farmen (2005a): Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. In: *Blood* 105 (7), S. 2869–2876.
- Aasheim, Hans-Christian; Delabie, Jan; Finne, Eivind Farmen (2005b): Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. In: *Blood* 105 (7), S. 2869–2876.
- Afzali, B.; Lombardi, G.; Lechler, R. I.; Lord, G. M. (2007): The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. In: *Clin. Exp. Immunol* 148 (1), S. 32–46.
- Alonso-C, Luis M.; Trinidad, Eva M. A.; Garcillan, Beatriz de; Ballesteros, Monica; Castellanos, Milagros; Cotillo, Ignacio et al. (2009): Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells. In: *Leuk. Res* 33 (3), S. 395–406.
- Andrian, U. H. von; Mackay, C. R. (2000): T-cell function and migration. Two sides of the same coin. In: *N. Engl. J. Med* 343 (14), S. 1020–1034.
- Archelos, J. J.; Storch, M. K.; Hartung, H. P. (2000): The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. In: *Ann. Neurol* 47 (6), S. 694–706.
- Arnon, R. (1996): The development of Cop 1 (Copaxone), an innovative drug for the treatment of multiple sclerosis: personal reflections. In: *Immunol. Lett* 50 (1-2), S. 1–15.
- Baranzini, S. E.; Jeong, M. C.; Butunoi, C.; Murray, R. S.; Bernard, C. C.; Oksenberg, J. R. (1999): B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. In: *J. Immunol* 163 (9), S. 5133–5144.
- Barun, Barbara; Bar-Or, Amit (2011): Treatment of multiple sclerosis with Anti-CD20 antibodies. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*.
- Benjamini, Yoav; Hochberg, Yosef (1995): Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. In: *Journal of the Royal Statistical Society*, S. 289–300.
- Ben-Nun, A.; Wekerle, H.; Cohen, I. R. (1981): The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. In: *Eur. J. Immunol* 11 (3), S. 195–199.
- Berer, Kerstin; Wekerle, Hartmut; Krishnamoorthy, Gurumoorthy (2011): B cells in spontaneous autoimmune diseases of the central nervous system. In: *Mol. Immunol* 48 (11), S. 1332–1337.
- Bjartmar, C.; Yin, X.; Trapp, B. D. (1999): Axonal pathology in myelin disorders. In: *J. Neurocytol* 28 (4-5), S. 383–395.
- Brückner, K.; Klein, R. (1998): Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands. In: *Curr. Opin. Neurobiol* 8 (3), S. 375–382.

- Carmi, Gal; Amital, Howard (2011): The geoepidemiology of autoimmunity: capsules from the 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, May 2010. In: *Isr. Med. Assoc. J* 13 (2), S. 121–127.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Anal. Biochem* 162 (1), S. 156–159.
- Cohen, Bruce A.; Rivera, Victor M. (2010): PRISMS: the story of a pivotal clinical trial series in multiple sclerosis. In: *Curr Med Res Opin* 26 (4), S. 827–838.
- Conover, J. C.; Doetsch, F.; Garcia-Verdugo, J. M.; Gale, N. W.; Yancopoulos, G. D.; Alvarez-Buylla, A. (2000): Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. In: *Nat. Neurosci* 3 (11), S. 1091–1097.
- Correale, Jorge; Ysrraelit, María Cécica; Gaitán, María Inés (2009): Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. In: *Brain* 132 (Pt 5), S. 1146–1160.
- Cross, A. H.; Trotter, J. L.; Lyons, J. (2001): B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. In: *J. Neuroimmunol* 112 (1-2), S. 1–14.
- Croxford, Andrew L.; Kurschus, Florian C.; Waisman, Ari (2011): Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1812 (2), S. 177–183.
- Cryan, John F.; Holmes, Andrew (2005): The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. In: *Nat Rev Drug Discov* 4 (9), S. 775–790.
- Derfuss, Tobias; Parikh, Khyati; Velhin, Sviataslau; Braun, Magdalena; Mathey, Emily; Krumbholz, Markus et al. (2009): Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106 (20), S. 8302–8307.
- Domingues, Helena S.; Mues, Marsilius; Lassmann, Hans; Wekerle, Hartmut; Krishnamoorthy, Gurumoorthy (2010): Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *PLoS ONE* 5 (11), S. e15531.
- Durelli, Luca; Conti, Laura; Clerico, Marinella; Boselli, Daniela; Contessa, Giulia; Ripellino, Paolo et al. (2009): T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. In: *Ann. Neurol* 65 (5), S. 499–509.
- Fabes, Jez; Anderson, Patrick; Brennan, Caroline; Bolsover, Stephen (2007): Regeneration-enhancing effects of EphA4 blocking peptide following corticospinal tract injury in adult rat spinal cord. In: *Eur. J. Neurosci* 26 (9), S. 2496–2505.
- Faulkner, Jill R.; Herrmann, Julia E.; Woo, Michael J.; Tansey, Keith E.; Doan, Ngan B.; Sofroniew, Michael V. (2004): Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. In: *J. Neurosci* 24 (9), S. 2143–2155.
- Filosa, Alessandro; Paixão, Sónia; Honsek, Silke D.; Carmona, Maria A.; Becker, Lore; Feddersen, Berend et al. (2009): Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. In: *Nat. Neurosci* 12 (10), S. 1285–1292.
- Flachenecker, Peter; Stuke, Kristin (2008): National MS registries. In: *J. Neurol* 255 Suppl 6, S. 102–108.

- Fletcher, J. M.; Lalor, S. J.; Sweeney, C. M.; Tubridy, N.; Mills, K. H. G. (2010): T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Clin. Exp. Immunol* 162 (1), S. 1–11.
- Freywald, Andrew; Sharfe, Nigel; Miller, Charlotte D'E; Rashotte, Cher; Roifman, Chaim M. (2006): EphA receptors inhibit anti-CD3-induced apoptosis in thymocytes. In: *J. Immunol* 176 (7), S. 4066–4074.
- Friese, Manuel A.; Fugger, Lars (2009): Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. In: *Ann. Neurol* 66 (2), S. 132–141.
- Frisullo, Giovanni; Nociti, Viviana; Iorio, Raffaele; Patanella, Agata K.; Caggiula, Marcella; Marti, Alessandro et al. (2009): Regulatory T cells fail to suppress CD4T⁺-bet⁺ T cells in relapsing multiple sclerosis patients. In: *Immunology* 127 (3), S. 418–428.
- Fugger, L. (2000): Human autoimmunity genes in mice. In: *Curr. Opin. Immunol* 12 (6), S. 698–703.
- Furtado, Gláucia C.; Marcondes, Maria Cecilia G.; Latkowski, Jo-Ann; Tsai, Julia; Wensky, Allen; Lafaille, Juan J. (2008): Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. In: *J. Immunol* 181 (7), S. 4648–4655.
- García-Ceca, Javier; Jiménez, Eva; Alfaro, David; Cejalvo, Teresa; Muñoz, Juan J.; Zapata, Agustín G. (2009): Cell-autonomous role of EphB2 and EphB3 receptors in the thymic epithelial cell organization. In: *Eur. J. Immunol* 39 (10), S. 2916–2924.
- Gay, F. W.; Drye, T. J.; Dick, G. W.; Esiri, M. M. (1997): The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. In: *Brain* 120 (Pt 8), S. 1461–1483.
- Getts, M. T.; Miller, S. D. (2010): 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: triggering of autoimmune diseases by infections. In: *Clin. Exp. Immunol* 160 (1), S. 15–21.
- Goldshmit, Yona; Galea, Mary P.; Bartlett, Perry F.; Turnley, Ann M. (2006a): EphA4 regulates central nervous system vascular formation. In: *J. Comp. Neurol* 497 (6), S. 864–875.
- Goldshmit, Yona; McLenachan, Samuel; Turnley, Ann (2006b): Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS. In: *Brain Res Rev* 52 (2), S. 327–345.
- Goldshmit, Yona; Galea, Mary P.; Wise, Graham; Bartlett, Perry F.; Turnley, Ann M. (2004): Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice. In: *J. Neurosci* 24 (45), S. 10064–10073.
- Groot, C. J. de; Montagne, L.; Barten, A. D.; Sminia, P.; van der Valk, P. (1999): Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, -beta2, and -beta3 isoforms and TGF-beta type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures. In: *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 58 (2), S. 174–187.
- Grunwald, I. C.; Korte, M.; Wolfer, D.; Wilkinson, G. A.; Unsicker, K.; Lipp, H. P. et al. (2001): Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. In: *Neuron* 32 (6), S. 1027–1040.

- Grunwald, Ilona C.; Korte, Martin; Adelman, Giselinde; Plueck, Anne; Kullander, Klas; Adams, Ralf H. et al. (2004): Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. In: *Nat. Neurosci* 7 (1), S. 33–40.
- Haas, Jürgen; Hug, Andreas; Viehöver, Andrea; Fritzsching, Benedikt; Falk, Christine S.; Filser, Andrea et al. (2005): Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. In: *Eur. J. Immunol* 35 (11), S. 3343–3352.
- Hafler, David A.; Compston, Alastair; Sawcer, Stephen; Lander, Eric S.; Daly, Mark J.; Jager, Philip L. de et al. (2007): Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. In: *N. Engl. J. Med* 357 (9), S. 851–862.
- Hafner, Christian; Schmitz, Gerd; Meyer, Stefanie; Bataille, Frauke; Hau, Peter; Langmann, Thomas et al. (2004): Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. In: *Clin. Chem* 50 (3), S. 490–499.
- Hauser, Stephen L.; Waubant, Emmanuelle; Arnold, Douglas L.; Vollmer, Timothy; Antel, Jack; Fox, Robert J. et al. (2008): B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. In: *N. Engl. J. Med* 358 (7), S. 676–688.
- Hemmer, Bernhard; Nessler, Stefan; Zhou, Dun; Kieseier, Bernd; Hartung, Hans-Peter (2006): Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. In: *Nat Clin Pract Neurol* 2 (4), S. 201–211.
- Henkemeyer, Mark; Itkis, Olga S.; Ngo, Michelle; Hickmott, Peter W.; Ethell, Iryna M. (2003): Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. In: *J. Cell Biol* 163 (6), S. 1313–1326.
- Hofstetter, Hh; Gold, R.; Hartung, H-P (2009): Th17 Cells in MS and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. In: *Int MS J* 16 (1), S. 12–18.
- Hohlfeld, Reinhard; Wekerle, Hartmut (2004): Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101 Suppl 2, S. 14599–14606.
- Holen, H. L.; Nustad, K.; Aasheim, H-C (2010): Activation of EphA receptors on CD4+CD45RO+ memory cells stimulates migration. In: *J. Leukoc. Biol* 87 (6), S. 1059–1068.
- Holland, S. J.; Peles, E.; Pawson, T.; Schlessinger, J. (1998): Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase beta. In: *Curr. Opin. Neurobiol* 8 (1), S. 117–127.
- Holley, J. E.; Gveric, D.; Newcombe, J.; Cuzner, M. L.; Gutowski, N. J. (2003): Astrocyte characterization in the multiple sclerosis glial scar. In: *Neuropathol. Appl. Neurobiol* 29 (5), S. 434–444.
- Holmberg, Johan; Armulik, Annika; Senti, Kirsten-André; Edoff, Karin; Spalding, Kirsty; Momma, Stefan et al. (2005): Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. In: *Genes Dev* 19 (4), S. 462–471.
- Hoppenbrouwers, Ilse A.; Aulchenko, Yurii S.; Janssens, A. Cecile; Ramagopalan, Sreeram V.; Broer, Linda; Kayser, Manfred et al. (2009): Replication of CD58 and CLEC16A as genome-wide significant risk genes for multiple sclerosis. In: *J. Hum. Genet* 54 (11), S. 676–680.

- Hufschmidt, Andreas; Hermann Lücking, Carl; Rauer, Sebastian (2009): Neurologie compact. s.l. Online verfügbar unter <http://ebooks.thieme.de/9783131171955/1>.
- Huppert, Julia; Closhen, Dorothea; Croxford, Andrew; White, Robin; Kulig, Paulina; Pietrowski, Ewelina et al. (2010): Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. In: *FASEB J* 24 (4), S. 1023–1034.
- Islam, Talat; Gauderman, W. James; Cozen, Wendy; Mack, Thomas M. (2007): Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. In: *Neurology* 69 (4), S. 381–388.
- Jager, Philip L. de; Jia, Xiaoming; Wang, Joanne; Bakker, Paul I. W. de; Ottoboni, Linda; Aggarwal, Neelum T. et al. (2009): Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. In: *Nat. Genet* 41 (7), S. 776–782.
- Jansen, Olav; Forsting, Michael; Sartor, Klaus; Bendszus, Martin (2008): Neuroradiologie. 16 Tabellen. 4. vollst. überarb. und erw. Stuttgart: THIEME (RRR Referenz-Reihe Radiologie).
- Jersild, C.; Fog, T.; Hansen, G. S.; Thomsen, M.; Svejgaard, A.; Dupont, B. (1973): Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. In: *Lancet* 2 (7840), S. 1221–1225.
- Jiao, Jian-Wei; Feldheim, David A.; Chen, Dong Feng (2008): Ephrins as negative regulators of adult neurogenesis in diverse regions of the central nervous system. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (25), S. 8778–8783.
- Johnson, K.P. Knobler R.L. Greenstein J.L (1990): Recombinant beta interferon treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis pilot study results.
- Kabat, E. A.; Moore, D. H.; Landow, H. (1942): An Electrophoretic Study of the Protein Components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum Proteins. In: *J. Clin. Invest* 21 (5), S. 571–577.
- Keegan, Mark; König, Fatima; McClelland, Robyn; Brück, Wolfgang; Morales, Yazmín; Bitsch, Andreas et al.: Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. In: *Lancet* 366 (9485), S. 579–582.
- Khan, O. A.; Tselis, A. C.; Kamholz, J. A.; Garbern, J. Y.; Lewis, R. A.; Lisak, R. P. (2001): A prospective, open-label treatment trial to compare the effect of IFN beta-1a (Avonex), IFNbeta-1b (Betaseron), and glatiramer acetate (Copaxone) on the relapse rate in relapsing-remitting multiple sclerosis. In: *Eur. J. Neurol* 8 (2), S. 141–148.
- Khodosevich, Konstantin; Watanabe, Yasuhito; Monyer, Hannah (2011): EphA4 preserves postnatal and adult neural stem cells in an undifferentiated state in vivo. In: *J. Cell. Sci* 124 (Pt 8), S. 1268–1279.
- Kobelt, G.; Berg, J.; Lindgren, P.; Fredrikson, S.; Jönsson, B. (2006): Costs and quality of life of patients with multiple sclerosis in Europe. In: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr* 77 (8), S. 918–926.
- Koch, Walter H. (2004): Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. In: *Nat Rev Drug Discov* 3 (9), S. 749–761.
- Krishnamoorthy, Gurumoorthy; Holz, Andreas; Wekerle, Hartmut (2007): Experimental models of spontaneous autoimmune disease in the central nervous system. In: *J. Mol. Med* 85 (11), S. 1161–1173.

- Krishnamoorthy, Gurumoorthy; Lassmann, Hans; Wekerle, Hartmut; Holz, Andreas (2006): Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. In: *J. Clin. Invest* 116 (9), S. 2385–2392.
- Krishnamoorthy, Gurumoorthy; Wekerle, Hartmut (2009): EAE: an immunologist's magic eye. In: *Eur. J. Immunol* 39 (8), S. 2031–2035.
- Krumbholz, Markus; Theil, Diethilde; Derfuss, Tobias; Rosenwald, Andreas; Schrader, Frank; Monoranu, Camelia-Maria et al. (2005): BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. In: *J. Exp. Med* 201 (2), S. 195–200.
- Kullander, K.; Mather, N. K.; Diella, F.; Dottori, M.; Boyd, A. W.; Klein, R. (2001): Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in major axon tract formation in vivo. In: *Neuron* 29 (1), S. 73–84.
- Kullander, Klas; Klein, Rüdiger (2002): Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 3 (7), S. 475–486.
- Lackmann, M.; Mann, R. J.; Kravets, L.; Smith, F. M.; Bucci, T. A.; Maxwell, K. F. et al. (1997): Ligand for EPH-related kinase (LERK) 7 is the preferred high affinity ligand for the HEK receptor. In: *J. Biol. Chem* 272 (26), S. 16521–16530.
- Lassmann, H.; Brück, W.; Lucchinetti, C. (2001): Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. In: *Trends Mol Med* 7 (3), S. 115–121.
- Levin, Lynn I.; Munger, Kassandra L.; O'Reilly, Eilis J.; Falk, Kerstin I.; Ascherio, Alberto (2010): Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. In: *Ann. Neurol* 67 (6), S. 824–830.
- Littman, Dan R.; Rudensky, Alexander Y. (2010): Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. In: *Cell* 140 (6), S. 845–858.
- Litzenburger, T.; Blüthmann, H.; Morales, P.; Pham-Dinh, D.; Dautigny, A.; Wekerle, H.; Iglesias, A. (2000): Development of myelin oligodendrocyte glycoprotein autoreactive transgenic B lymphocytes: receptor editing in vivo after encounter of a self-antigen distinct from myelin oligodendrocyte glycoprotein. In: *J. Immunol* 165 (9), S. 5360–5366.
- Litzenburger, T.; Fässler, R.; Bauer, J.; Lassmann, H.; Lington, C.; Wekerle, H.; Iglesias, A. (1998): B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. In: *J. Exp. Med* 188 (1), S. 169–180.
- Liu, Xuebin; Leung, Stewart; Wang, Chunxia; Tan, Zhu; Wang, Ji; Guo, Taylor B. et al. (2010): Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease. In: *Nat. Med* 16 (2), S. 191–197.
- Lock, Christopher; Hermans, Guy; Pedotti, Rosetta; Brendolan, Andrea; Schadt, Eric; Garren, Hideki et al. (2002): Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. In: *Nat. Med* 8 (5), S. 500–508.
- Lowenthal, A.; Vansande, M.; Karcher, D. (1960): The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically the CSF gamma-globulins. In: *J New Drugs* 6, S. 51–56.

- Luo, Hongyu; Yu, Guang; Wu, Yulian; Wu, Jiangping (2002): EphB6 crosslinking results in costimulation of T cells. In: *J. Clin. Invest* 110 (8), S. 1141–1150.
- Luo, Hongyu; Yu, Guang; Tremblay, Johanne; Wu, Jiangping (2004): EphB6-null mutation results in compromised T cell function. In: *J. Clin. Invest* 114 (12), S. 1762–1773.
- Mandala, Suzanne; Hajdu, Richard; Bergstrom, James; Quackenbush, Elizabeth; Xie, Jenny; Milligan, James et al. (2002): Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. In: *Science* 296 (5566), S. 346–349.
- Mathey, Emily K.; Derfuss, Tobias; Storch, Maria K.; Williams, Kieran R.; Hales, Kimberly; Woolley, David R. et al. (2007): Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. In: *J. Exp. Med* 204 (10), S. 2363–2372.
- Matloubian, Mehrdad; Lo, Charles G.; Cinamon, Guy; Lesneski, Matthew J.; Xu, Ying; Brinkmann, Volker et al. (2004): Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. In: *Nature* 427 (6972), S. 355–360.
- Matusevicius, D.; Kivisäkk, P.; He, B.; Kostulas, N.; Ozenci, V.; Fredrikson, S.; Link, H. (1999): Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. In: *Mult. Scler* 5 (2), S. 101–104.
- McDonald, W. I.; Compston, A.; Edan, G.; Goodkin, D.; Hartung, H. P.; Lublin, F. D. et al. (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. In: *Ann. Neurol* 50 (1), S. 121–127.
- Mix, Eilhard; Meyer-Rienecker, Hans; Hartung, Hans-Peter; Zettl, Uwe K. (2010): Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. In: *Prog. Neurobiol* 92 (3), S. 386–404.
- Mohan, Hema; Krumbholz, Markus; Sharma, Rakhi; Eisele, Sylvia; Junker, Andreas; Sixt, Michael et al. (2010): Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: Fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells. In: *Brain Pathol* 20 (5), S. 966–975.
- Monson, Nancy L.; Brezinschek, Hans-Peter; Brezinschek, Ruth I.; Mobley, Angela; Vaughan, Gwen K.; Frohman, Elliot M. et al. (2005): Receptor revision and atypical mutational characteristics in clonally expanded B cells from the cerebrospinal fluid of recently diagnosed multiple sclerosis patients. In: *J. Neuroimmunol* 158 (1-2), S. 170–181.
- Montes, Monica; Zhang, Xin; Berthelot, Laureline; Laplaud, David-Axel; Brouard, Sophie; Jin, Jianping et al. (2009): Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. In: *Clin. Immunol* 130 (2), S. 133–144.
- Munger, Cassandra L.; Levin, Lynn I.; Hollis, Bruce W.; Howard, Noel S.; Ascherio, Alberto (2006): Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. In: *JAMA* 296 (23), S. 2832–2838.
- Munger, KI; Levin, Li; O'Reilly, Ej; Falk, Ki; Ascherio, A. (2011): Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. In: *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*.

- Munoz, J. J.; Bernard, C. C.; Mackay, I. R. (1984): Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen. In: *Cell. Immunol* 83 (1), S. 92–100.
- Muñoz, Juan J.; Alfaro, David; García-Ceca, Javier; Alonso-C, Luis M.; Jiménez, Eva; Zapata, Agustín (2006): Thymic alterations in EphA4-deficient mice. In: *J. Immunol* 177 (2), S. 804–813.
- Munro, Kathryn M.; Dixon, Kirsty J.; Gresle, Melissa M., Jonas, Anna; Kemper, Dennis; Doherty, William; Fabri, Louis J; Owczarek, Catherine M.; Pearse, Martin; Boyd, Andrew W.; Kilpatrick, Trevor J.; Butzkueven, Helmut; Turnley, Ann M. (2013): EphA4 Receptor Tyrosine Kinase Is a Modulator of Onset and Disease Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), In: *Plos One* 8(2).
- Murai, Keith K.; Nguyen, Louis N.; Koolpe, Mitchell; McLennan, Rebecca; Krull, Catherine E.; Pasquale, Elena B. (2003): Targeting the EphA4 receptor in the nervous system with biologically active peptides. In: *Mol. Cell. Neurosci* 24 (4), S. 1000–1011.
- Murai, Keith K.; Pasquale, Elena B. (2003): 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. In: *J. Cell. Sci* 116 (Pt 14), S. 2823–2832.
- Murai, Keith K.; Pasquale, Elena B. (2002): Can Eph receptors stimulate the mind? In: *Neuron* 33 (2), S. 159–162.
- Nakanishi, Hiroshi; Nakamura, Tatsuya; Canaani, Eli; Croce, Carlo M. (2007): ALL1 fusion proteins induce deregulation of EphA7 and ERK phosphorylation in human acute leukemias. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104 (36), S. 14442–14447.
- Navikas, V. and Link H. (1996): Review: Cytokines and the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. In: *Journal of Neuroscience Research* 45:322-333.
- Noseworthy, J. H.; Lucchinetti, C.; Rodriguez, M.; Weinshenker, B. G. (2000): Multiple sclerosis. In: *N. Engl. J. Med* 343 (13), S. 938–952.
- Nowak, Elizabeth C.; Weaver, Casey T.; Turner, Henrietta; Begum-Haque, Sakhina; Becher, Burkhard; Schreiner, Bettina et al. (2009): IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. In: *J. Exp. Med* 206 (8), S. 1653–1660.
- Obermeier, Birgit; Mentele, Reinhard; Malotka, Joachim; Kellermann, Josef; Kümpfel, Tania; Wekerle, Hartmut et al. (2008): Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. In: *Nat. Med* 14 (6), S. 688–693.
- Oksenberg, Jorge R.; Barcellos, Lisa F.; Cree, Bruce A. C.; Baranzini, Sergio E.; Bugawan, Teodorica L.; Khan, Omar et al. (2004): Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. In: *Am. J. Hum. Genet* 74 (1), S. 160–167.
- Oldstone, M. B. (1987): Molecular mimicry and autoimmune disease. In: *Cell* 50 (6), S. 819–820.
- Olivieri, G.; Miescher, G. C. (1999): Immunohistochemical localization of EphA5 in the adult human central nervous system. In: *J. Histochem. Cytochem* 47 (7), S. 855–861.
- Onose, G.; Anghelescu, A.; Muresanu, D. F.; Padure, L.; Haras, M. A.; Chendreau, C. O. et al. (2009): A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury. In: *Spinal Cord* 47 (10), S. 716–726.

- Orioli, D.; Henkemeyer, M.; Lemke, G.; Klein, R.; Pawson, T. (1996): Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. In: *EMBO J* 15 (22), S. 6035–6049.
- Pasquale, Elena B. (2008): Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. In: *Cell* 133 (1), S. 38–52.
- Paterson, P. Y. (1960): Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. In: *J. Exp. Med* 111, S. 119–136.
- Perry, M. E.; Kirkpatrick, W. N.; Happerfield, L. C.; Gleeson, M. J. (1996): Expression of adhesion molecules on the microvasculature of the pharyngeal tonsil (adenoid). In: *Acta Otolaryngol Suppl* 523, S. 47–51.
- Pette, M.; Fujita, K.; Kitze, B.; Whitaker, J. N.; Albert, E.; Kappos, L.; Wekerle, H. (1990): Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. In: *Neurology* 40 (11), S. 1770–1776.
- Pöllinger, Bernadette; Krishnamoorthy, Gurumoorthy; Berer, Kerstin; Lassmann, Hans; Bösl, Michael R.; Dunn, Robert et al. (2009a): Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. In: *J. Exp. Med* 206 (6), S. 1303–1316.
- Pöllinger, Bernadette; Krishnamoorthy, Gurumoorthy; Berer, Kerstin; Lassmann, Hans; Bösl, Michael R.; Dunn, Robert et al. (2009b): Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. In: *J. Exp. Med* 206 (6), S. 1303–1316.
- Polman, Chris H.; Reingold, Stephen C.; Banwell, Brenda; Clanet, Michel; Cohen, Jeffrey A.; Filippi, Massimo et al. (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. In: *Ann. Neurol* 69 (2), S. 292–302.
- Pugliatti, M.; Rosati, G.; Carton, H.; Riise, T.; Drulovic, J.; Vécsei, L.; Milanov, I. (2006): The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. In: *Eur. J. Neurol* 13 (7), S. 700–722.
- Ramagopalan, Sreeram V.; Ebers, George C. (2009): Epistasis: multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. In: *Neurology* 72 (6), S. 566–567.
- Ray, Avijit; Mann, Monica K.; Basu, Sreemanti; Dittel, Bonnie N. (2011): A case for regulatory B cells in controlling the severity of autoimmune-mediated inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. In: *J. Neuroimmunol* 230 (1-2), S. 1–9.
- Ricard, Jerome; Salinas, Jessica; Garcia, Lissette; Liebl, Daniel J. (2006): EphrinB3 regulates cell proliferation and survival in adult neurogenesis. In: *Mol. Cell. Neurosci* 31 (4), S. 713–722.
- Rivers, T. M.; Sprunt, D. H.; Berry, G. P. (1933): Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. In: *J. Exp. Med* 58 (1), S. 39–53.
- Sadovnick, A. D.; Armstrong, H.; Rice, G. P.; Bulman, D.; Hashimoto, L.; Paty, D. W. et al. (1993): A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. In: *Ann. Neurol* 33 (3), S. 281–285.
- Saint-Vis, Blandine de; Bouchet, Caroline; Gautier, Gregory; Valladeau, Jenny; Caux, Christophe; Garrone, Pierre (2003): Human dendritic cells express neuronal Eph

- receptor tyrosine kinases: role of EphA2 in regulating adhesion to fibronectin. In: *Blood* 102 (13), S. 4431–4440.
- Schmidt, Rudolf Manfred; Hoffmann, Frank (Hg.) (2012): Multiple Sklerose. 5. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Schultz, J.; Ponting, C. P.; Hofmann, K.; Bork, P. (1997): SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. In: *Protein Sci* 6 (1), S. 249–253.
- Sharfe, Nigel; Nikolic, Martina; Cimpeon, Lorand; van de Kratts, Alison; Freywald, Andrew; Roifman, Chaim M. (2008): EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions. In: *Mol. Immunol* 45 (5), S. 1208–1220.
- Sharma, Sushil; Mathur, A. G.; Pradhan, Sapna; Singh, D. B.; Gupta, Sparsh (2011): Fingolimod (FTY720): First approved oral therapy for multiple sclerosis. In: *J Pharmacol Pharmacother* 2 (1), S. 49–51.
- Shimonkevitz, R.; Colburn, C.; Burnham, J. A.; Murray, R. S.; Kotzin, B. L. (1993): Clonal expansions of activated gamma/delta T cells in recent-onset multiple sclerosis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90 (3), S. 923–927.
- Simmons, David L. (2005): Anti-adhesion therapies. In: *Curr Opin Pharmacol* 5 (4), S. 398–404.
- Sladkova, Vladimira; Mareš, Jan; Lubenova, Blanka; Zapletalova, Jana; Stejskal, David; Hlustik, Petr; Kanovsky, Petr (2011): Degenerative and inflammatory markers in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients with relapsing-remitting course of disease and after clinical isolated syndrome. In: *Neurol. Res* 33 (4), S. 415–420.
- Sobel, Raymond A. (2005): Ephrin A receptors and ligands in lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. In: *Brain Pathol* 15 (1), S. 35–45.
- Stapleton, D.; Balan, I.; Pawson, T.; Sicheri, F. (1999): The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. In: *Nat. Struct. Biol* 6 (1), S. 44–49.
- Steinman, L. (1999): Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. In: *Neuron* 24 (3), S. 511–514.
- Stromnes, Ingunn M.; Goverman, Joan M. (2006a): Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. In: *Nat Protoc* 1 (4), S. 1952–1960.
- Stromnes, Ingunn M.; Goverman, Joan M. (2006b): Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. In: *Nat Protoc* 1 (4), S. 1810–1819.
- Takasu, Mari A.; Dalva, Matthew B.; Zigmond, Richard E.; Greenberg, Michael E. (2002): Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors. In: *Science* 295 (5554), S. 491–495.
- Thacker, Evan L.; Mirzaei, Fariba; Ascherio, Alberto (2006): Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. In: *Ann. Neurol* 59 (3), S. 499–503.
- Tzartos, John S.; Friese, Manuel A.; Craner, Matthew J.; Palace, Jackie; Newcombe, Jia; Esiri, Margaret M.; Fugger, Lars (2008): Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. In: *Am. J. Pathol* 172 (1), S. 146–155.

- van Wijmeersch, Bart; Sprangers, Ben; Rutgeerts, Omer; Lenaerts, Caroline; Landuyt, Willy; Waer, Mark et al. (2007): Allogeneic bone marrow transplantation in models of experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for a graft-versus-autoimmunity effect. In: *Biol. Blood Marrow Transplant* 13 (6), S. 627–637.
- Viglietta, Vissia; Baecher-Allan, Clare; Weiner, Howard L.; Hafler, David A. (2004): Loss of functional suppression by CD4+CD25+regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. In: *J. Exp. Med* 199 (7), S. 971–979.
- Wang, H. U.; Anderson, D. J. (1997): Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. In: *Neuron* 18 (3), S. 383–396.
- Wekerle, H. (2008): Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. In: *Ann. Rheum. Dis* 67 Suppl 3, S. iii56-60.
- Wekerle, H.; Kojima, K.; Lannes-Vieira, J.; Lassmann, H.; Linington, C. (1994): Animal models. In: *Ann. Neurol* 36, S. S47-53.
- Wiendl, H.; Toyka, K. V.; Rieckmann, P.; Gold, R.; Hartung, H-P; Hohlfeld, R. (2008): Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: current therapeutic recommendations. In: *J. Neurol* 255 (10), S. 1449–1463.
- Wu, Jiangping; Luo, Hongyu (2005): Recent advances on T-cell regulation by receptor tyrosine kinases. In: *Curr. Opin. Hematol* 12 (4), S. 292–297.
- Wucherpfennig, K. W.; Newcombe, J.; Li, H.; Keddy, C.; Cuzner, M. L.; Hafler, D. A. (1992): Gamma delta T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89 (10), S. 4588–4592.
- Yamaguchi, Yu; Pasquale, Elena B. (2004): Eph receptors in the adult brain. In: *Curr. Opin. Neurobiol* 14 (3), S. 288–296.
- Yi, Huanfa; Zhen, Yu; Jiang, Lingling; Zheng, Jialin; Zhao, Yong (2006): The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. In: *Cell. Mol. Immunol* 3 (3), S. 189–195.
- Yu, Guang; Mao, Jianning; Wu, Yulian; Luo, Hongyu; Wu, Jiangping (2006): Ephrin-B1 is critical in T-cell development. In: *J. Biol. Chem* 281 (15), S. 10222–10229.
- Zozulya, Alla L.; Wiendl, Heinz (2008): The role of CD8 suppressors versus destructors in autoimmune central nervous system inflammation. In: *Hum. Immunol* 69 (11), S. 797–804.

8. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Hartmut Wekerle, Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld, Prof. Dr. Edgar Meinl und Dr. Markus Krumbholz, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben am Max-Planck-Institut für Neurobiologie meine Disseration zu absolvieren. Des Weiteren danke ich insbesondere Prof. Dr. Edgar Meinl und Dr. Markus Krumbholz für die Unterstützung, die anregenden Diskussionen und die konstruktive Kritik.

Von ganzem Herzen möchte ich Dr. Kerstin Berer und Dr. Gurumoorthy Krishnamoorthy für die wunderbare Unterstützung und Hilfestellung bei den EAE-Versuchen danken. Liebste Kerstin, du hast so manche Zeit im Labor für mich versüßt.

Ich danke ganz herzlich meinen geliebten Eltern und meinen Geschwistern Tanja und Julian sowie meinen Großeltern, die in Gedanken immer bei mir waren, mir Kraft gegeben haben und mich grenzenlos unterstützt haben. Ich liebe Euch – ohne Euch alle wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke Dad, der immer, auch in den schwierigsten Phasen, für mich da war. Ich liebe Dich.

Ich danke allen meinen Freunden, die immer zu mir gestanden haben, auch wenn ich zum Teil wenig Zeit für sie hatte. Schön, dass es Euch gibt.

Ich danke allen, insbesondere meiner Arbeitsgruppe, die diese Arbeit möglich gemacht hat. Tausend Dank.

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Verena Nadine Loleit
Geburtsdatum	16.04.1984
Geburtsort	Ulm
Anschrift	Auenstr. 60, 80469 München
Familienstand	ledig

SCHULAUUSBILDUNG

1990 – 1994	Grundschule Pfuhl
1994 – 2003	Bertha-von-Suttner Gymnasium, Neu-Ulm
27.06.2003	Allgemeine Hochschulreife, Durchschnittsnote 1,0

HOCHSCHULAUUSBILDUNG

WS 04/05 – SS 06	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München und an der Technischen Universität München (vorklinischer Studienabschnitt)
26.09.2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Durchschnittsnote 2,0
WS 06/07 – SS 2011	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München (klinischer Studienabschnitt)
16.06.2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Durchschnittsnote 1,5
15.06.2011	Approbation als Ärztin

FAMULATUREN

26.02.2007 – 28.03.2007	Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München
30.07.2007 – 28.08.2007	Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Internistische Intensivmedizin des Städtischen Klinikums München-Schwabing

01.09.2008 – 30.09.2008	Ambulanz der Klinischen Neuroimmunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
01.09.2009 – 01.10.2009	Praxis für Neurologie, PD Dr. med. Bernd Sporer in München

PRAKTISCHES JAHR

22.02.2010 – 16.04.2010	Chirurgische Klinik der Universitäts-Kinderkliniken der Universität Zürich, Schweiz
19.04.2010 – 11.06.2010	Chirurgische Klinik des Klinikums Hôpital Jean Verdier der Universität Paris XIII, Frankreich
14.06.2010 – 01.10.2010	Neurologische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
04.20.2010 – 26.11.2010	I. Medizinische Klinik und Poliklinik (Deutsches Herzzentrum) des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
29.11.2010 – 21.01.2011	III. Medizinische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München

Beruf

Seit 01.09.2011	Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, Prof. Hemmer
-----------------	---