

Aus der Augenklinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. A. Kampik

**Der Einfluss des partiellen MCP-1/CCL2-Antagonisten
[¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf den Verlauf der experimentellen
Autoimmunuveitis**

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

Vorgelegt von
Andreas Helck
aus München
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer.nat. Dipl.Biol. G. Wildner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. N. Plesnila
PD Dr. med. U. Kummer

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer.nat. Dipl.Biol. M. Diedrichs-Möhring
PD Dr. med. S. Thureau

Dekan: Prof. Dr. med D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis:	5
A. Einleitung	7
1. Uveitis und experimentelle Autoimmunuveitis (EAU).....	7
2. Orale Toleranzinduktion	13
3. Klassifikation der Chemokine	14
4. Chemokine und Zellmigration	16
5. Monocyte chemoattractant protein (MCP-1/CCL2)	18
5.1 Funktionen und Expression von MCP-1/CCL2	18
5.2 Die Funktion von MCP-1/CCL2 bei der humanen Uveitis und der EAU	19
5.3 Modifikation des MCP-1/CCL2.....	20
B. Material und Methoden	21
1. Material	21
1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	21
1.3 Antikörper	22
1.4 Peptide.....	22
1.5 PBS.....	22
1.6 Versuchstiere.....	22
1.7 [¹⁸ AA ¹⁹]-MCP-1	23
2.1 Induktion der Uveitis.....	23
2.2 Orale Toleranzinduktion	24
2.3. Klinische Graduierung der Uveitis.....	26
3. Histologie	27
3.1 Anfertigung der Gefrierschnitte	27
3.2 Herstellung der histologischen Präparate.....	27
3.3 Färbung der Präparate mit Hämatoxylin	28
3.4 Histologische Graduierung.....	29
3.5 Immunhistochemische Färbung:	31
4. Zellkultur.....	35

Inhaltsverzeichnis

C. Ergebnisse.....	36
1. Aktive Immunisierung mit Peptiden	36
1.1 Immunisierung mit PDSAg.....	36
1.2 Immunisierung mit R14	41
2. Adoptiver Transfer aktivierter T-Zellen.....	44
2.1 Transfer PDSAg-spezifischer T-Zellen.....	44
2.2 Transfer R14 spezifischer T-Zellen.....	50
3. Einfluss von [¹⁸ AA ¹⁹]-MCP-1 auf die orale Toleranzinduktion (OTI).....	53
3.1 Intraperitoneale Gabe von [¹⁸ AA ¹⁹]-MCP-1	54
3.2 Orale Gabe von [¹⁸ AA ¹⁹]-MCP-1.....	56
4. Immunhistochemische Färbungen.....	58
5. Immunfluoreszenzfärbung:	60
D. Diskussion	61
E. Zusammenfassung	71
F. Literaturverzeichnis	73
G. Anhang	86
1. Danksagung:.....	86
2. Lebenslauf	87

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis:

[¹⁸ AA ¹⁹]-MCP-1	modifiziertes Monocyte Chemoattractant Protein
Abb	Abbildung
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APZ	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
AU	anteriore Uveitis
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
DZ	dendritische Zelle
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalitis
EAU	experimentelle Autoimmunuveitis
FCS	fötale Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykane
GALT	Gut associated lymphoid tissue
Grad.	Graduierung
hist.	histologisch
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRBP	Interphotorezeptor-retinoid-bindendes Protein
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
klin.	klinisch
MCP-1	Monozyte Chemoattractant Protein
MG	Molekulargewicht
MIP1- α	Migration inhibition protein-alpha
ml	Milliliter
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OTI	orale Toleranzinduktion
PBS	phosphatgepufferte Saline

Abkürzungsverzeichnis

PDSAg	Peptid aus dem S-Ag
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
RPE	retinales Pigmentepithel
R14	Peptid aus IRBP
S-Ag	retinal soluble Antigen
s.c.	subkutan
SCM	spleen conditioned medium
S.E.	Standardfehler
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Wo	Wochen
μ g	Mikrogramm

A. Einleitung

1. Uveitis und experimentelle Autoimmunuveitis (EAU)

In dieser Arbeit soll die Wirkung des partiellen MCP-1-Antagonisten [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf den Krankheitsverlauf der experimentellen Autoimmun-Uveitis (EAU) untersucht werden. Als Versuchstiere wurden Lewis-Ratten verwendet.

Im klinischen Sprachgebrauch wird jede intraokulare Entzündung allgemein als Uveitis bezeichnet, obwohl der Begriff Uvea (lat. Traube) strenggenommen nur die stark pigmentierten, gefäßführenden Schichten wie Iris, Ziliarkörper und Aderhaut umfaßt. In den Industrieländern wird die Inzidenz der Uveitis mit 17-30/100 000 angegeben; die Prävalenz beträgt ca. 40-200/100 000 Einwohnern.

Die Uveitiden werden sowohl nach anatomischer Lokalisation als auch nach ätiologischen Gesichtspunkten eingeteilt. Nach anatomischer Lokalisation wird eine anteriore (Iritis, Iridozyklitis) von einer intermediären (z.B. Pars Planitis) und einer posterioren Form (Chorioiditis, Chorioretinitis) unterschieden. Ist sowohl die vordere als auch die hintere Augenkammer betroffen, bezeichnet man dies als Panuveitis (Bloch, 1987). Nach der Ätiologie differenziert man zwischen einer erregerbedingten Uveitis (z.B. Toxoplasma gondii, Candida species, Tuberkelbakterien, Herpesviren-Familie) und einer Uveitis autoimmunen Ursprungs. Die häufigere Form ist dabei die spontan auftretende Autoimmunuveitis mit einem Anteil von über 80% an allen Uveitiden (de Smet und Chan, 2001). Die Autoimmunuveitis kann als isolierte Erkrankung (viele Iritis-Formen oder White-Dot-Syndrome wie z.B. Birdshot-Chorioretinopathie) oder auch im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen auftreten. So sind z.B. der Morbus Bechterew, die Psoriasis, die Colitis, die juvenile chronische Arthritis und der Morbus Behcet häufig mit einer Uveitis assoziiert.

Bei der Autoimmunuveitis beobachtet man entweder einen chronisch progredienten oder einen schubförmigen Verlauf, wobei die Mehrzahl der Patienten unter chronisch rezidivierenden, mehrere Wochen anhaltenden Iriditiden leidet. Die beschwerdefreien Intervalle sind in ihrer Länge und Häufigkeit individuell unterschiedlich und können einen Zeitraum von mehreren Wochen bis hin zu Jahrzehnten umfassen.

A. Einleitung

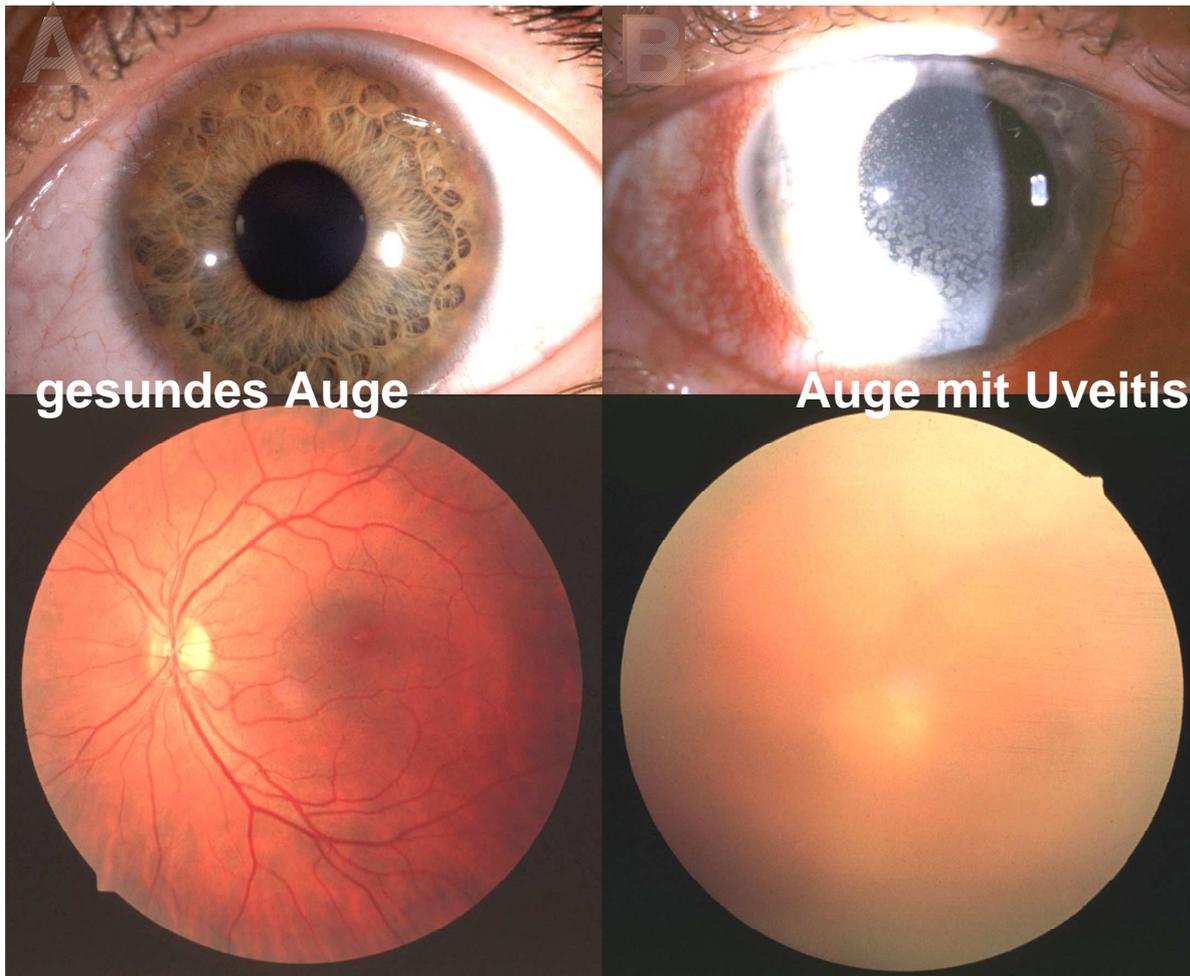


Abb. 1: Klinische Bilder der humanen Uveitis: Die Bilder auf der linken Seite zeigen ein gesundes Auge mit dem entsprechenden Augenhintergrund. Das Bild rechts oben zeigt ein Auge mit Iritis, die Bindehaut ist stark entzündet und die Vorderkammer zeigt eine Infiltration mit Entzündungszellen und einen Endothelbeschlag. Im Bild unten rechts ist der Augenhintergrund bei einer posterioren Uveitis dargestellt. Durch das massive Glaskörperinfiltrat sind die einzelnen Strukturen nur noch schwach zu erkennen. Fotos zur Verfügung gestellt von G. Wildner und S.R. Thurau

Die Entzündung von Aderhaut und Netzhaut führt zu einer Funktionseinschränkung dieser Strukturen und somit zu einem Visusverlust. Desweiteren werden durch die chronische Entzündungsreaktion häufig auch andere okuläre Strukturen wie z.B. Glaskörper, Sklera, Linse, Hornhautendothel oder Trabekelwerk irreversibel geschädigt. Durch diese Destruktionen können später Komplikationen wie z.B. Ablatio retinae, Glaukom und Katarakt eintreten. Für die Patienten bedeutet dies einen weitergehenden Visusverlust gegebenenfalls bis hin zur vollständigen Erblindung. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen richtet sich die Immunantwort bei der Autoimmunuveitis gegen körpereigene Antigene. Warum es im Krankheitsverlauf immer wieder zu einem Sistieren der Entzündung kommen kann, obwohl

A. Einleitung

weiterhin entsprechende okuläre Autoantigene vorhanden sind, ist noch nicht vollständig geklärt (Gery et al., 1986a). Es werden immunregulatorische Vorgänge vermutet, die wahrscheinlich durch Suppressorzellen vermittelt werden.

Die Frage, wie es zu einer Immunreaktion gegen intraokuläre Antigene kommen kann, ist nicht sicher geklärt. Das Auge ist ein immunprivilegiertes Organ und besitzt keine Lymphdrainage. Desweiteren wird eine Entzündungsreaktion im Auge normalerweise durch die Blut-Retina-Schranke, eine Barriere für Zellen des Immunsystems, verhindert. Die Blut-Retina-Schranke kann nur dann von Entzündungszellen überwunden werden, wenn diese zuvor aktiviert worden sind. Nach einer Hypothese werden spezifisch T-Zellen durch ähnliche Antigene außerhalb des Auges (z.B. HLA-Antigene, Virusantigene, etc.) aktiviert, können in diesem Zustand in das Auge einwandern und reagieren im Sinne einer Kreuzreaktion mit den entsprechenden okulären Antigenen. Dies wird auch als „antigene Mimikry“ bezeichnet (Wildner et al., 1994; Wildner & Diedrichs-Möhring, 2003).

Während antigenspezifische Lymphozyten die Immunreaktion vermitteln, sind die im Krankheitsverlauf durch Entzündungsmediatoren (bestimmte inflammatorische Cytokine und Chemokine) rekrutierten, unspezifischen Entzündungszellen (Makrophagen und Granulozyten) für die Gewebeschädigung verantwortlich (Caspi et al., 1993).

Die Therapie der Autoimmunuveitis gestaltet sich schwierig und beschränkt sich bisher auf die Applikation entzündungshemmender und immunsupprimierender Medikamente mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen.

Um neue Therapieansätze zu entwickeln, ist eine genaue Kenntnis der immunpathologischen Mechanismen von großer Bedeutung. Daher wurden für die Uveitis verschiedene Tiermodelle etabliert (Meerschweinchen, Ratten, Mäuse, Affen, Pferde) (de Smet und Chan, 2001). Die Induktion der experimentellen Autoimmunuveitis (EAU) bei Ratte und Maus sind die am häufigsten verwendeten Tiermodelle.

Um eine EAU auszulösen, werden den Versuchstieren retinale Antigene als Emulsion mit komplettem Freund'schem Adjuvans (CFA) subcutan injiziert, was auch als „aktive Immunisierung“ bezeichnet wird. Auf diese Weise werden spezifische T-Lymphozyten aktiviert, welche die Blut-Retina-Schranke überwinden können („afferente Phase“ der Immunreaktion). Im Auge werden diese Zellen durch Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen reaktiviert und lösen dort eine lokale Entzündungsreaktion aus, was auch als „efferente Phase“ der Immunreaktion bezeichnet wird. Die EAU kann auch direkt durch den Transfer entsprechender, in der Zellkultur generierte T-Zelllinien induziert werden. Somit können die

A. Einleitung

afferente und efferente Phase der Immunreaktion getrennt untersucht werden. In dieser Dissertation wurde die EAU bei Lewis-Ratten als Modell verwendet.

Als retinale Autoantigene sind bei der Lewis-Ratte das retinale S-Ag (S-Antigen, retinal soluble antigen) und das IRBP (Interphotorezeptor-retinoid-bindendes Protein) bekannt. Das S-Ag ist eine intrazelluläre Tyrosinkinase und ein wesentlicher Bestandteil der Photorezeptoraußensegmente (Beneski et al., 1984). Das IRBP ist ein von den Photorezeptorzellen sezerniertes, extrazelluläres Transportprotein (Borst et al., 1989; Fong et al., 1984).

Bei der Lewis-Ratte setzt die Uveitis akut ein, verläuft monophasisch und führt innerhalb weniger Tage zu starken retinalen Destruktionen. Die histopathologischen Veränderungen zeigen dabei Ähnlichkeiten mit denen der humanen Uveitis (Faure, 1980, Gery et al., 1986).

Der exakte Krankheitsverlauf ist allerdings variabel und hängt von dem verwendeten Antigen ab. Während IRBP zu einer starken Entzündungsreaktion in der Vorderkammer führt (de Smet et al., 2001), wird bei Verwendung von S-Ag vor allem eine Entzündung und Destruktion des hinteren Augensegmentes beobachtet. Dies beruht auf einem unterschiedlichen Migrationverhalten der entsprechenden T-Zelllinien. R14 spezifische T-Zellen wandern präferentiell über retinale Gefäße ein, wohingegen PDSAgspezifische T-Zellen von der Aderhaut zunächst durch das angrenzende retinale Pigmentepithel (RPE) migrieren, und dann die weiter innen liegenden Netzhautschichten infiltrieren. Desweiteren scheinen im Verlauf der entsprechenden Entzündungsreaktionen auch Unterschiede in Bezug auf die involvierten Chemokine zu bestehen (Diedrichs-Möhring et al., 2005).

Neben den vollständigen Proteinen können auch die Peptide R14 (Rinder-IRBP, Aminosäure 1169–1191) und PDSAgs (Rinder-S-Ag, Aminosäure 342-355) zur Induktion der EAU verwendet werden, da sie pathogene Epitope enthalten (Gregerson et al., 1989; Gregerson et al., 1990; de Smet et al., 1993).

Diese Peptide wurden auch im Rahmen der folgenden Untersuchung verwendet.

Uveitis bei der Lewis-Ratte, klinisches und histologisches Bild:

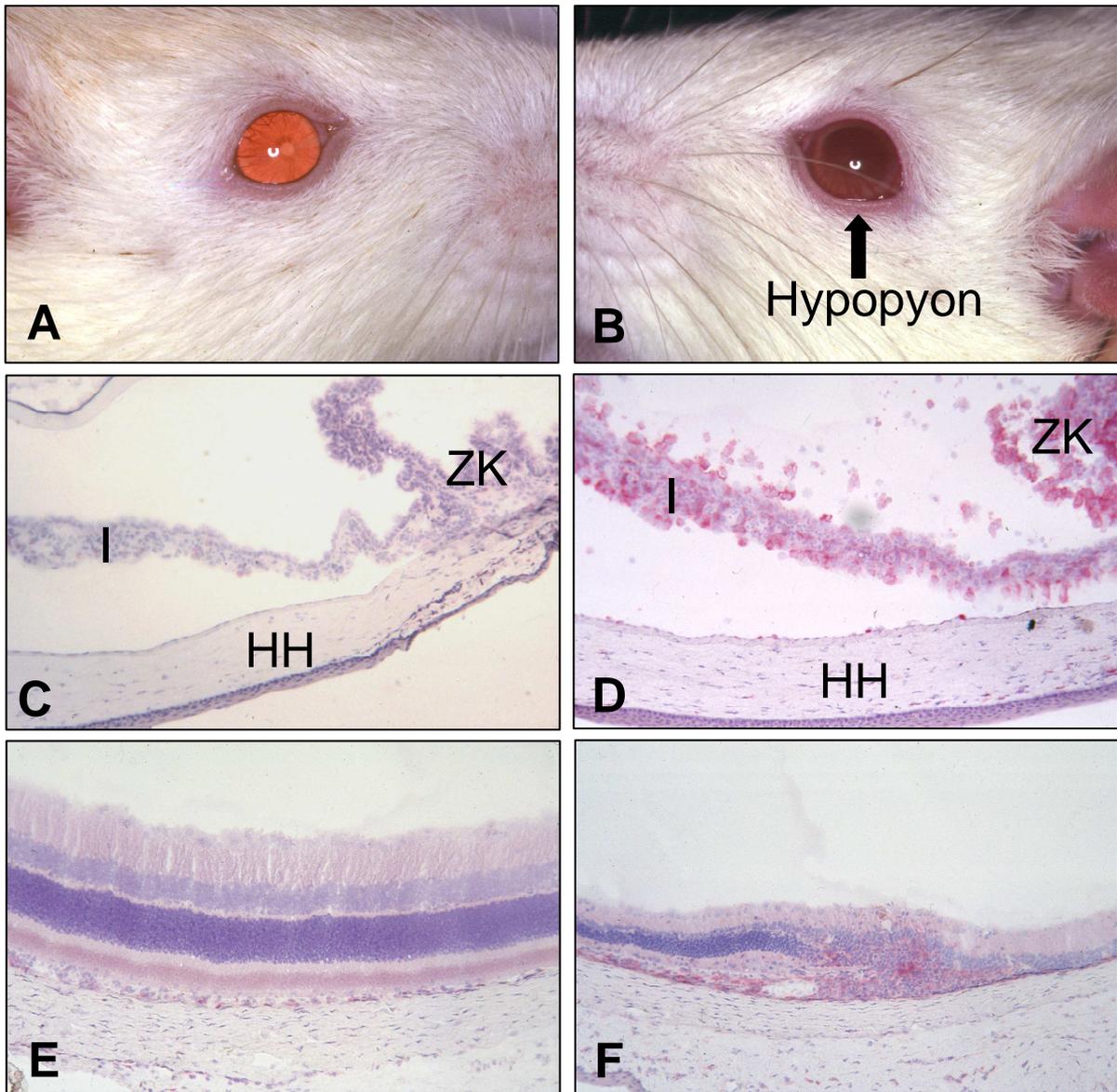


Abb. 2: A, B: Klinisches Bild eines gesunden Rattenauges (A) sowie eines Rattenauges mit Uveitis (B). Das Auge zeigt ein Hypopyon (steriles Leukozytensediment) in der Vorderkammer. C, D: Histologie des vorderen Augenabschnitts, gesund (C) und Rattenaug mit Iritis (D), (HH: Hornhaut, I: Iris, ZK: Ziliarkörper, rot gefärbt sind CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen) E,F: intakte Retina (E) und zerstörte Retina (F) nach heftiger posteriorer Uveitis (CD4⁺ T-Zellen rot gefärbt). Fotos zur Verfügung gestellt von G.Wildner.

A. Einleitung

Bei der EAU spielt die Immunreaktion vom zellulären (Th₁)-Typ die Hauptrolle, da die Erkrankung durch den Transfer von spezifischen, aktivierten CD4⁺ T-Helferzellen auf gesunde Tiere übertragen werden kann (Charteris et al., 1992; Barton et al., 1993; Barton et al., 1995). Eine Übertragung durch Serum ist hingegen nicht pathogen (Caspi et al., 1986).

Von den aktivierten spezifischen T-Zellen infiltriert nur eine geringe Anzahl das Auge und ist für die Rekrutierung einer Vielzahl von unspezifischen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen verantwortlich (Palestine et al., 1986; Prendergast et al., 1998). Am bedeutendsten ist dabei die Infiltration durch Monozyten/Makrophagen, welche bei der EAU in großer Anzahl im Auge nachzuweisen sind. Bisher ging man davon aus, dass Makrophagen zwar CD4, nicht aber CD8 exprimieren können (Jeffries et al., 1985; Perry & Gordon, 1987). Schroeter et al. konnten jedoch zeigen, dass CD8⁺ Makrophagen im Verlauf der EAE in der Ratte das ZNS infiltrieren (Schroeter et al., 2003). Die EAE ist ein Krankheitsmodell für die Multiple Sklerose und wird wie die EAU durch CD4⁺ T-Zellen vermittelt. Über die genaue Funktion der CD8⁺ Makrophagen ist noch wenig bekannt, jedoch können Signale über das CD8-Molekül zu einer Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren führen (Lin et al., 2000).

Die Rekrutierung der unspezifischen Leukozyten erfolgt über die lokale Ausschüttung unterschiedlicher Signalmoleküle (Cytokine, Chemokine), welche eine Adhäsion der Entzündungszellen an das Endothel mit nachfolgender Transmigration in das Zielgewebe ermöglichen (Caspi et al., 1999).

Da das Ausmaß der Gewebeschädigung und damit die Schwere der Erkrankung eng mit der Anzahl und dem Aktivierungszustand der unspezifischen Entzündungszellen korreliert (Caspi et al., 1993), wäre die Verhinderung der Zellrekrutierung ein aussichtsreicher therapeutischer Ansatz.

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss einer modifizierten Form des Chemokins MCP-1/CCL2, [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf den Verlauf der EAU untersucht. In getrennten Versuchen wurde die EAU dabei sowohl durch aktive Immunisierung, als auch durch adoptiven Transfer induziert.

Desweiteren wurde geprüft welchen Einfluss eine [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Behandlung auf die orale Toleranzinduktion hat.

2. Orale Toleranzinduktion

Eine Suppression der EAU ist auch durch die sogenannte „orale Toleranzinduktion“ zu erzielen. Dabei wird die Immunantwort durch die orale Applikation des entsprechenden Antigens abgeschwächt.

Der amerikanische Forscher H. G. Wells beobachtete bereits 1911, dass Meerschweinchen keine Reaktion auf eine Immunisierung mit Hühnerei- und Milchproteinen entwickelten, wenn diese zuvor mit Hühnerei- und Milcheiweiß gefüttert worden waren (Wells, 1911).

Die orale Toleranzinduktion wird durch das GALT (gut associated lymphoid tissue) vermittelt, und soll unnötige Reaktionen des Immunsystems gegen apathogene Antigene wie z.B. Nahrungsbestandteile verhindern (DePaolo et al., 2003).

Eine tolerogene Wirkung weisen allerdings nicht alle immunogenen Antigene auf. Der Mechanismus, über den das periphere Immunsystem moduliert wird, ist zudem abhängig von der verwendeten Antigenmenge. Eine hohe Dosierung des Antigens bewirkt in der Regel eine Deletion oder Anergie der spezifischen T-Zellen, während nach einer niedrigen Dosierung vor allem regulatorische T-Zellen (Suppressorzellen) heranreifen, welche über Cytokine wie z.B. TGF- β supprimierend wirken (Strobel, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde die orale Toleranz ausschließlich durch niedrig dosierte, intragastrale Applikation des Antigens induziert.

Der Krankheitsverlauf einiger Autoimmunkrankheiten konnte durch orale Verabreichung bestimmter Antigene bereits positiv beeinflusst werden (Nussenblatt et al., 1990; Weiner et al., 1997).

Neben dem retinalen S-Antigen (Nussenblatt et al., 1997) wurde bei Patienten mit einer Autoimmunuveitis auch ein HLA-Peptid erfolgreich als orales Tolerogen verwendet (Thurau et al., 1999). Im Verlauf der mehrjährigen Studie konnte ein deutlicher Rückgang der Entzündungsintensität festgestellt werden (Thurau et al., 2003).

Der genaue Mechanismus, über den die orale Toleranzinduktion vermittelt wird, ist noch Gegenstand der Forschung.

Wildner et al. konnten durch Transfer-Experimente im Rattenmodell nachweisen, dass antigenspezifische γ/δ TCR⁺ Zellen im Rahmen einer oralen Toleranzinduktion eine immunsuppressive Wirkung übertragen können (Wildner et al., 1996). Die orale Toleranz kann aber auch durch andere Zellen wie z.B. CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen und dendritische Zellen vermittelt werden (Strobel, 2002).

A. Einleitung

Es wird angenommen, dass das Chemokin MCP-1 (CCL2) und sein Rezeptor CCR2 ebenfalls an der Generierung der oralen Toleranz beteiligt sind (Karpus et al., 1998; DePaolo et al., 2003). Daher wurde in den letzten Experimenten dieser Arbeit der Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf die orale Toleranzinduktion untersucht.

3. Klassifikation der Chemokine

Die Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe wird durch das Zusammenspiel einer Vielzahl von Signalmolekülen ermöglicht. Einen bedeutenden Anteil haben dabei die Chemokine, welche eine Adhäsion der Leukozyten an das Endothel mit nachfolgender Transmigration bewirken können (Sallusto et al., 2000).

Bis heute sind mehr als 44 Chemokine und 21 Chemokinrezeptoren beschrieben worden (Murphy et al., 2000; Rossi et al., 2000; Segerer et al., 2000).

Chemokine sind 8 bis 10 kDa schwere Moleküle und weisen untereinander eine 20-70 %-ige Homologie bezüglich ihrer Aminosäuresequenz auf.

In der neuen Nomenklatur werden die Chemokine – abhängig von der charakteristischen Anordnung der Cysteine am N-terminalen Ende - in vier Klassen unterteilt. Fast alle Chemokine weisen insgesamt vier Cysteine auf, von denen sich jeweils zwei am Anfang und am Ende des Peptids befinden.

In der CC-Gruppe sind die zwei N-terminalen Cystein-Aminosäuren aufeinanderfolgend angeordnet, wohingegen in der CXC-Gruppe eine beliebige Aminosäure zwischen den Cystein-Aminosäuren liegt. Eine weitere Gruppe ist dadurch charakterisiert, dass sie eine CX₃C-Muster aufweist; hier sind die N-terminalen Cysteine durch drei Aminosäuren getrennt. Eine Ausnahme stellt das Lymphotactin bzw. C-Chemokin dar. Es besitzt nur zwei Cysteine, jeweils ein N-terminal und ein C-terminal lokalisiertes Cystein.

Diese neue, systematische Klassifikation ersetzt die bisherige Einteilung nach Eigennamen (wie z.B. IL-8 = CXCL8, MCP-1 = CCL2, etc.).

A. Einleitung

Die Chemokine binden mit ihrem N-terminalen Ende an G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembran-Anteilen, welche entsprechend der Chemokinklassifikation in eine CCR-, CXCR-, CX3CR- und CR-Gruppe unterteilt werden.

Durch Bindung des Chemokins wird die entsprechende Zelle aktiviert, was letztendlich zur Einleitung physiologischer Prozesse wie z.B. Leukozytenmigration, Lymphozytenreifung, Angiogenese oder Angiostase führt (Rossi et al., 2000).

Einige Rezeptoren können durch mehrere Chemokine aktiviert werden, während einige Chemokine wiederum an mehrere verschiedene Rezeptoren binden können. Somit ergibt sich ein System von großer Variabilität und Redundanz (Nelson et al., 2001).

4. Chemokine und Zellmigration

Chemokine sind vor allem für ihre Eigenschaft bekannt, spezifische Leukozyten anzulocken, zu aktivieren und an der Transmigration in das entzündete Gewebe mitzuwirken (Seegerer et al., 2000; Zlotnik et al., 2000). Die Entzündungszellen werden dabei durch einen Chemokin-Konzentrationsgradienten an die entsprechende Stelle geleitet und durch Bindung des Chemokins an den Rezeptor aktiviert.

Diese Aktivierung ist der erste Schritt in einem Prozess, an dessen Ende die Transmigration der Immunzelle in das entzündete Gewebe steht.

Während das N-terminale Ende der Chemokine an den spezifischen Chemokinrezeptor bindet, bindet das basische, C-terminale Ende an die sauren Glykosaminoglykane (GAG) der Endothelzellen. Dies ist nötig, um ein Wegwaschen der Chemokine durch den Blutstrom zu verhindern (Proudfoot et al., 2003). Für bestimmte Chemokine konnte nachgewiesen werden, dass eine spezifische Aminosäuresequenz am C-Terminus für die GAG-Bindung, und damit für die Rekrutierungsaktivität der Chemokine essentiell ist (Proudfoot et al., 2003; Chakravarty et al., 1998).

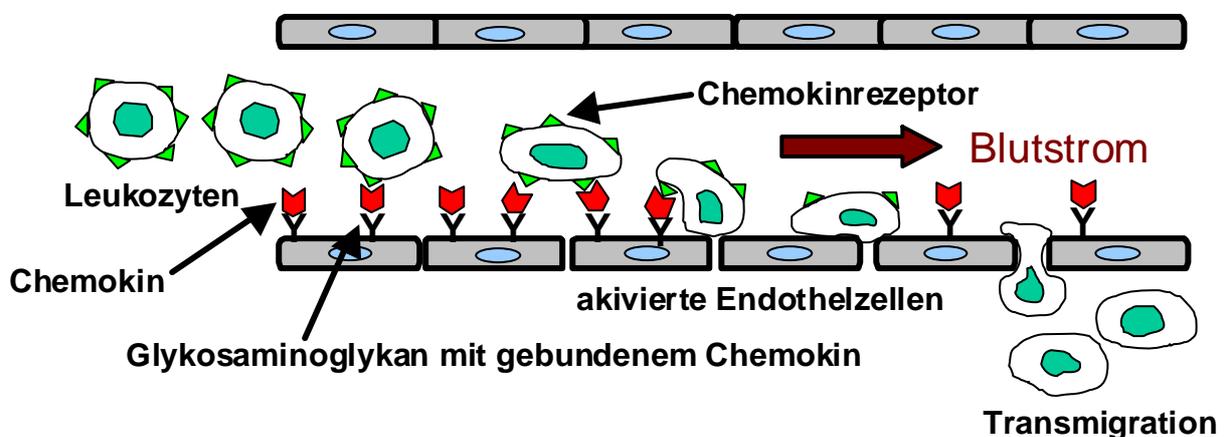


Abb. 3: Interaktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren unter physiologischen Bedingungen: Chemokine binden mit dem C-terminalen Ende an die Glykosaminoglykane der Endothelzellen, führen zur Aktivierung der Leukozyten und leiten die Transmigration der Leukozyten ein.

A. Einleitung

Schon seit längerer Zeit wird an möglichst spezifischen Therapieansätzen geforscht. Eine Möglichkeit besteht in der gezielten Inhibition der durch Chemokine vermittelten Rekrutierung von Entzündungszellen.

Eine Blockade der „Signalübermittlung“ könnte sowohl an der Ligand-Rezeptor-Interaktion, als auch an der anschließenden intrazellulären Signalkaskade erfolgen und ist bereits Gegenstand der aktuellen Forschung (Proudfoot et al., 2003; Johnson et al., 2005b).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Beeinflussung der Interaktion zwischen Chemokinen und den Glykosaminoglykanen der Endothelzellen. Diese GAG-Bindung ist bei bestimmten Chemokinen Voraussetzung für die chemotaktische Aktivität *in vivo* (Proudfoot et al., 2003, Johnson et al., 2005b). Die Blockade der GAG-Bindung durch Modifikation am C-terminalen Ende könnte demnach auch die chemotaktische Aktivität des entsprechenden Chemokins aufheben (Proudfoot et al., 2003; Johnson et al., 2005a; Johnson et al., 2005b).

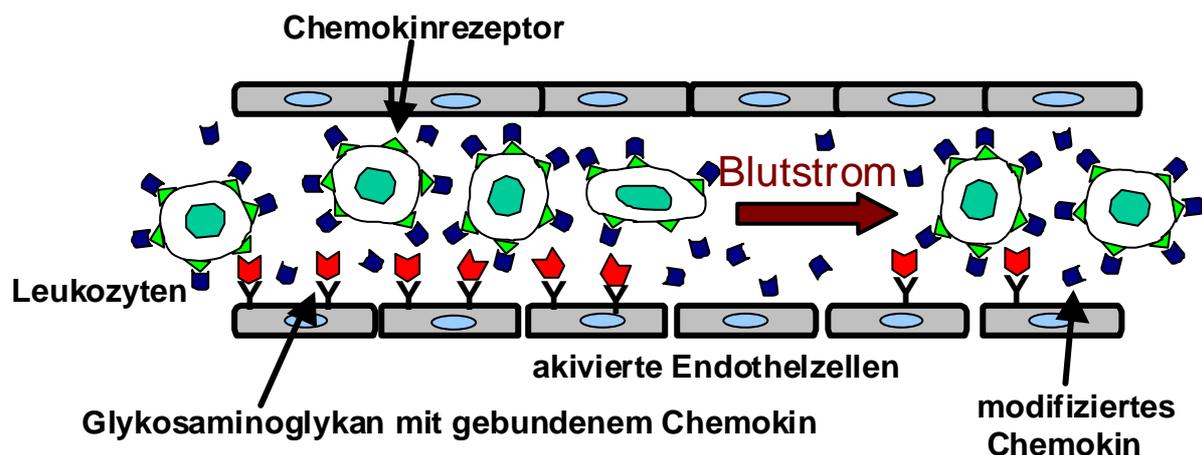


Abb. 4: Blockade der chemotaktischen Funktion von Chemokinen durch modifizierte Chemokine (partielle Chemokinrezeptorantagonisten): Durch Modifikation am C-terminalen Ende verliert das Chemokin seine Fähigkeit, an die Glykosaminoglykane der Endothelzellen zu binden und verhindert somit die Anheftung an das Endothel. Es findet keine Einwanderung der vorbeiströmenden Leukozyten in das darunterliegende Gewebe statt.

5. Monocyte chemoattractant protein (MCP-1/CCL2)

5.1 Funktionen und Expression von MCP-1/CCL2

Das Chemokin MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) bzw. nach der neuen Nomenklatur CCL2 war eines der ersten entdeckten Chemokine und ist schon lange Gegenstand der Forschung (Matsushima et al. 1988; Rollins et al., 1989; Yoshimura et al., 1989). Charakteristisch für MCP-1/CCL-2 ist, dass es *in vitro* eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten hat (Leonard et al., 1990; Rollins, 1991) und das MCP-1/CCL-2 nur an einen Rezeptor, nämlich an CCR2 bindet. In einer großen Anzahl von *in vivo* Experimenten konnte diese starke chemotaktische Wirkung bestätigt werden (Huang et al., 2001; Fife et al., 2000).

MCP-1/CCL-2 wird von Endothelzellen nach Stimulation durch TNF- α , IFN- γ , Lipopolysaccharide und Lipoproteine (Chakravarty et al., 1998) synthetisiert und sekretiert. Allerdings ist eine große Anzahl anderer Zellen ebenfalls zur MCP-1/CCL-2-Produktion befähigt (Rollins, 1997).

So weisen im Auge Zellen des Hornhaut-Endothels und des retinalen Pigmentepithels (RPE) eine gesteigerte Synthese von MCP-1 nach Stimulation mit proinflammatorischen Cytokinen wie z.B. IL-1 α , IFN- γ und TNF- α auf (Yamagami et al., 2003; Hollborn et al., 2000).

Zudem wurde während der oralen Toleranzinduktion eine signifikant erhöhte MCP-1-Konzentration in der intestinalen Schleimhaut festgestellt. Die Verwendung von Antikörpern gegen MCP-1/CCL-2 verhinderte die Entwicklung einer oralen Toleranz (Karpus et al., 1998).

Viele Immun- und Gewebezellen weisen den Rezeptor für MCP-1/CCL-2 auf. So exprimieren neben Monozyten u.a. auch dendritische Zellen (DZ), T-Zellen, regulatorische T-Zellen, NK-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten den Chemokinrezeptor CCR2 (Murphy et al., 2000; Nelson et al., 2001; Brühl et al., 2004).

5.2 Die Funktion von MCP-1/CCL-2 bei der humanen Uveitis und der EAU

Es wird angenommen, dass MCP-1/CCL-2 eine wichtige Funktion bei der Pathogenese okulärer Entzündungen einnimmt. So konnte bei Patienten mit aktiver Uveitis eine signifikante Erhöhung von MCP-1/CCL-2 im Kammerwasser nachgewiesen werden (Verma et al., 1997; Curnow et al., 2005). Das RPE, das auch einen Teil der Blut-Retina-Schranke bildet, nimmt dabei eine Schlüsselposition ein.

Bei Versuchen mit menschlichen retinalen Pigmentepithelzellen konnte gezeigt werden, dass RPE-Zellen permanent geringe Mengen MCP-1/CCL-2 sekretieren (Crane et al., 2000; Hollborn et al., 2000). Nach Stimulation mit proinflammatorischen Cytokinen (IL-1 α , IFN- γ und TNF- α) kommt es zu einer signifikanten Zunahme der MCP-1/CCL-2-Produktion durch RPE-Zellen (Elner et al., 1997; Crane et al., 2000; Hollborn et al., 2000).

Das von RPE-Zellen sekretierte MCP-1/CCL-2 induziert *in vitro* eine starke chemotaktische Aktivität für Monozyten. Durch Blockierung mit Antikörpern gegen MCP-1/CCL-2 konnte die Anzahl der rekrutierten Monozyten dabei um mehr als die Hälfte verringert werden (Elner et al., 1997).

MCP-1/CCL-2 könnte also nach Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke (Elner et al., 1997) zusammen mit einigen anderen Chemokinen maßgeblich an der Einwanderung von Monozyten und anderen Entzündungszellen in das retinale Gewebe beteiligt sein (Crane et al., 2000).

Diese Vermutung wurde im Tierversuch durch den direkten Nachweis von erhöhten intraokulären MCP-1/CCL-2-Konzentrationen im Verlauf der EAU bestätigt. Das Chemokin ist dabei an eingewanderte Leukozyten gebunden (Crane et al., 2001).

Auch im Verlauf der EAE-assoziierten, anterioren Uveitis (AU) der Lewis-Ratte korrelieren die gemessenen MCP-1/CCL-2-Spiegel mit der Entzündungsintensität, ein Großteil der eingewanderten Entzündungszellen exprimiert zudem den entsprechenden Rezeptor CCR2 (Adamus et al., 2001).

MCP-1/CCL-2 scheint eine bedeutende Funktion in der Pathogenese der EAU einzunehmen. Die Blockierung des entzündungsverstärkenden Effektes von MCP-1/CCL-2 durch die Verabreichung des partiellen CCR2-Antagonisten [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 wäre demnach ein erfolversprechender Ansatz zur Abschwächung der Entzündungsintensität.

5.3 Modifikation des MCP-1/CCL2

Wie unter 4. beschrieben, sind bestimmte Aminosäuren am C-terminalen Ende der Chemokine für die Bindung an die Glykosaminoglykane der Endothelzellen notwendig. Ein Austausch dieser Aminosäuren führt zu einer dramatisch verringerten GAG-Bindungsaktivität. Die Interaktion der Chemokine mit dem Chemokinrezeptor wird dadurch allerdings nicht beeinflusst (Chakravarty et al., 1998).

In den folgenden Versuchen wurde [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 verwendet, welches man durch Austausch von Arginin gegen Alanin an Position 18 und von Lysin gegen Alanin an Position 19 erhält. Bei *in vivo* Versuchen kann für das [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 eine Blockierung der chemotaktischen Aktivität beobachtet werden (Proudfoot et al., 2003).

Somit wäre die Inhibition der chemotaktischen Aktivität des MCP-1/CCL-2 im Falle der EAU ein erfolgversprechender therapeutischer Ansatz.

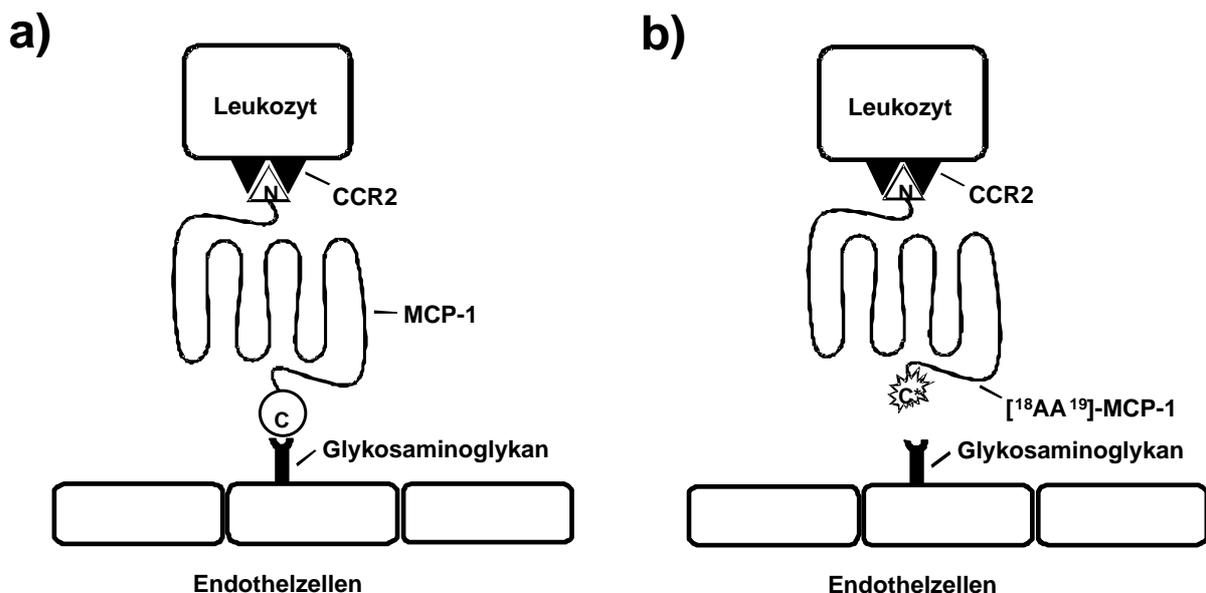


Abb. 5: a) Die Interaktion des Chemokins MCP-1/CCL-2 mit einem Leukozyten (N-terminales Ende bindet an CCR2) und einer Endothelzelle (C-terminales Ende bindet an GAG) führt zur Aktivierung des Leukozyten und leitet die Transmigration ein. b) Austausch zweier Aminosäuren am C-terminalen Ende führt zum Verlust der GAG-Bindungsfähigkeit: Das an den Leukozyten gebundene [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 heftet sich nicht an die Glykosaminoglykane, der Leukozyt wird vom Blutstrom fortgetragen. Man beobachtet somit keine chemotaktische Aktivität *in vivo*.

B. Material und Methoden

1. Material

1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

AMPD	Serva, Heidelberg
Aminosäuren, essentiell	Life Technologies, Karlsruhe
Aminosäuren, nicht essentiell	Life Technologies, Karlsruhe
Beta-Mercaptoäthanol	Sigma, Taufkirchen
CFA	BD, Becton Dickinson, Heidelberg
Con A	BD, Becton Dickinson, Heidelberg
Entwicklungspuffer	Merck, Darmstadt
FCS (Fötale Kälberserum)	Biochrom, Berlin
Gewebekultur-Plastikmaterial	Renner, Darmstadt
Kayser´s Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kryostat	Fa. Jung
komplettes Freund´sches Adjuvans (CFA)	BD, Wiesbaden
L-Glutamin	SIGMA, Taufkirchen
Levamisol	Sigma, Taufkirchen
MCP-1/CCL-2 (Monozyte Chemoattractant Protein)	Serono Pharmaceutical Institute, Geneva, CH
Methyl-alpha D-Mannopyranosid	Sigma, Taufkirchen
Naphtol-AS-Bisphosphat	Serva, Heidelberg
OCT-Tissue-Tec	Sakura Finetek, Zoeterwouder
Neufuchsin	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Penicillin	Sigma, Taufkirchen
Peptide (PSDSA _g , R14)	Biotrend, Köln
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Pyruvat	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640	PAA, Cölbe
Sterilfilter	Gelman Sciences, Michigan, USA

B. Material und Methoden

Streptomycinsulfat

Seromed, Berlin

Trypanblau

Life Technologies, Karlsruhe

Alle anderen hier nicht aufgeführten Materialien stammen von den Firmen Merck und Sigma.

1.3 Antikörper

1.3.1 Antikörper für indirekte Oberflächen-Immunfluoreszenzfärbung

TCR α/β (T-Zellrezeptor): R73 (BD, Wiesbaden)

CD8 α : Ox 8 (BD, Wiesbaden)

ED1: CD 68 (Serotech)

1.3.2 Antikörper für Immunhistochemie (dianova, Hamburg)

Brückenantikörper: Fab 2-Ratte-anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg)

APAAP-Komplex (Maus-monoklonaler anti-alkalische Phosphatase Antikörper, komplexiert mit alkalischer Phosphatase)

1.4 Peptide

PDSAg (S-Ag, aa 342-355, FLGELTSSEVATEV)

R 14 (IRBP, aa 1169-1191, PTARSVGAADGSSWEGVGVVPDV)

1.5 PBS

Das verwendete PBS enthielt die folgenden Bestandteile:

40,0 g NaCl

1,0 g KCl

7,20 g Na₂ HPO₄

1,0 g KH₂ PO₄

ad 5000 ml H₂O bidest

1.6 Versuchstiere

Für alle Tierexperimente wurden Lewis-Ratten beiderlei Geschlechts im Alter von fünf bis zehn Wochen verwendet. Die Tiere wurden von einem kommerziellen Züchter (Janvier, Le-Genest-St-Isle/France) bezogen oder stammten aus der Eigenzucht. Die Tiere wurden in Filterhaubenisolier-Käfigen gehalten; Wasser und Nahrung waren ad libitum vorhanden.

B. Material und Methoden

Mittels einer Zeitschaltuhr wurde ein konstanter circadianer Rhythmus von 12h:12h eingehalten.

Gewichtstabelle:

Alter	4 Wo	5 Wo	6 Wo	7 Wo	8 Wo	9 Wo	10 Wo	11 Wo
Weibl.	62,8 g	92,6 g	125,5 g	146,0 g	162,9g	173,7	186,6 g	196,2g
Männl.	67,6 g	103,9 g	152,7 g	193,8 g	234,5 g	261,9 g	285,5 g	304,6 g

1.7 [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1

Das [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 wurde dankenswerterweise von Frau Dr. A. Proudfoot, Serono Pharmaceutical (Genf) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um humanes MCP-1/CCL-2, welches durch den Austausch zweier Aminosäuren modifiziert wurde. Durch den Austausch von Arginin (Position 18) und Lysin (Position 19) durch die Aminosäure Alanin hat diese MCP-1/CCL-2-Variante ihre GAG-Bindungsfähigkeit verloren. [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 kann zwar noch an seinen Rezeptor CCR2 binden und die entsprechende Zelle aktivieren, es entfaltet aber keine chemotaktische Aktivität, da es nicht mit den Glykosaminoglykanen der Endothelzellen interagieren kann (wie unter 5.3).

Die Wirkung von humanem MCP-1/CCL-2 auf den entsprechenden Rezeptor CCR2 bei Rattenzellen wurde sowohl durch *in vitro*, als auch *in vivo* Untersuchungen bestätigt. Zachariae et al. konnten mit humanem MCP-1/CCL-2 eine verstärkte Makrophagenmigration bei Lewis-Ratten *in vivo* induzieren (Zachariae et al., 1990), und in der Zellkultur wurde ein mitogener Effekt von humanem MCP-1/CCL-2 auf glatte Zellen glatter Gefäßmuskel von Ratten (Porreca et al., 1997) beobachtet.

2.1 Induktion der Uveitis

2.1.1 Immunisierung

Zur Induktion einer EAU wurden die Ratten mit den Peptiden retinaler Proteine - PDSAg (Peptidsequenz aus dem S-Ag) bzw. R14 (Peptid aus IRBP) - s.c. immunisiert. Um eine uveitogene Wirkung zu erzielen, musste den Peptiden komplettes Freund'sches Adjuvans (CFA, zusätzlich angereichert mit 2 mg/ml Mycobacterium tuberculosis R 37) hinzugefügt werden. Das jeweilige Peptid in PBS und (CFA) wurden im Verhältnis 1:2 mit Ultraschall emulgiert, bevor jeweils 100 µl davon in die Außenseite jedes Hinterbeinchens injiziert wurden. Die Antigenmenge betrug pro Ratte 15 µg PDSAg bzw. 50 µg R14.

B. Material und Methoden

Um den Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf den Uveitisverlauf zu untersuchen, wurde den Ratten ab dem Zeitpunkt der Immunisierung täglich 500 µg [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1/kg KG, gelöst in 0,5 ml PBS, i.p. injiziert. Sobald klinische Zeichen einer Uveitis beim ersten Tier der Kontrollgruppe zu sehen waren, wurde die Injektionsserie beendet. Als Kontrolle erhielt die gleiche Anzahl immunisierter Tiere während des selben Zeitraumes tägliche i.p.-Injektionen von 0,5 ml PBS.

Da sich die Uveitis erfahrungsgemäß ca. ab dem 10. Tag – abhängig vom jeweiligen Antigen - nach Immunisierung klinisch manifestiert, wurde ab dem 8. Tag mit der Kontrolle der Augen begonnen. Dazu wurden die Ratten in der Hand gehalten und der Vorderkammerbereich mit einem Ophthalmoskop ausgeleuchtet. Der Verlauf der Uveitis wurde entsprechend der Graduierung nach de Smet et al. (1993) dokumentiert. Nach Abklingen der Uveitis wurden die Tiere abschließend durch CO₂ eingeschlafert und die Augen zur histologischen Auswertung entnommen.

2.1.2 Adoptiver Transfer von antigenspezifischen T-Zell-Linien

Eine EAU kann in der Lewis-Ratte außerdem durch den Transfer antigenaktivierter, spezifischer T-Zellen ausgelöst werden. 48 h nach in-vitro-Stimulation mit dem jeweiligen Antigen wurden jeweils 2,5 – 5,0 x 10⁶ Zellen, aufgenommen in 0,5 ml vorgewärmtem RPMI-Medium, pro Ratte i.p. injiziert.

Zur Untersuchung des Einflusses von MCP-1 auf den Uveitisverlauf wurde den Ratten ab dem Tag des Transfers täglich [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 wie oben beschrieben, verabreicht. Die Dosierung betrug, soweit nicht gesondert vermerkt, ebenfalls 500 µg/kg KG. Die Kontrollgruppe erhielt eine tägliche i.p.-Injektion von 0,5 ml PBS.

Nach dem adoptiven Transfer werden die ersten klinischen Zeichen der EAU ab dem 5.Tag erwartet, deshalb wurde mit der klinischen Untersuchung bereits am 4.Tag begonnen. Die Ergebnisse wurden in gleicher Weise graduiert und dokumentiert wie für die aktive Immunisierung beschrieben. Ebenso wurde der Versuch mit der histologischen Auswertung der Augen abgeschlossen.

2.2 Orale Toleranzinduktion

Gegen uveitogene Antigene kann durch orale Verabreichung von identischen oder strukturverwandten Antigenen eine Toleranz induziert werden.

B. Material und Methoden

Im Tierversuch wurde mit der Antigen-Fütterung 6 - 7 Tage vor der aktiven Immunisierung begonnen. Zur Fütterung wurden handelsübliche, ca. 6 - 7 cm lange Knopfkanülen verwendet. Diese wurden vorsichtig über den Tracheaabgang hinaus in den Ösophagus vorgeschoben, um eine definierte Menge des Antigens (jeweils 200 µg, verdünnt in 0,5 ml PBS) mittels einer Injektionsspritze langsam in den Magen zu applizieren. Dadurch war eine zuverlässige und vollständige Dosierung sichergestellt.

Aus der Fragestellung, ob und wie MCP-1/CCL-2 die orale Toleranzinduktion beeinflussen könnte, ergab sich folgende Versuchsanordnung: Die Tiere erhielten während der oralen Tolerisierung täglich [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 (500 µg/kg KG, aufgenommen in 0,5 ml PBS). Um die Wirkung von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf die orale Toleranzinduktion zu beschränken, wurde die Behandlung am Tag vor der aktiven Immunisierung beendet.

Mit der klinischen Untersuchung inklusive Graduierung und Dokumentation wurde am 8.Tag nach erfolgter Immunisierung begonnen. Die Experimente wurden ca. 20 Tage nach der Immunisierung beendet und die Augen für die Histologie aufbereitet.

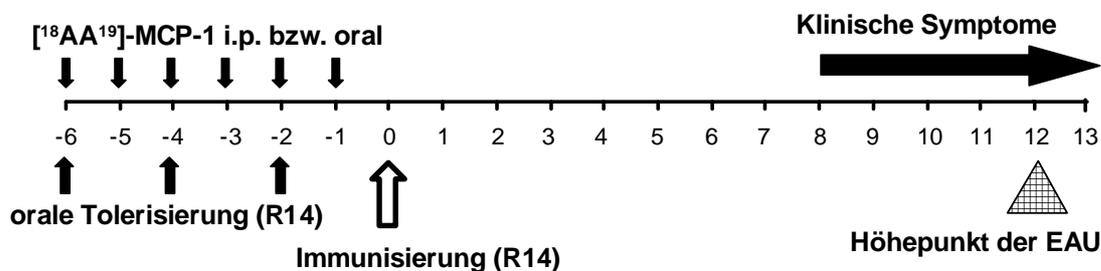


Abb. 6: Schematischer Verlauf der oralen Toleranzinduktion und [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1/CCL-2-Behandlung vor Induktion der EAU durch aktive Immunisierung mit R14

2.3. Klinische Graduierung der Uveitis

Im Verlauf der Uveitis kommt es zu einem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke, so dass Entzündungszellen in das Auge einwandern können. Die klinische Untersuchung bezieht sich auf die Infiltration der Vorderkammer, die Einstufung der Uveitisintensität wird anhand folgender Graduierung (nach de Smet et al, 1993) vorgenommen:

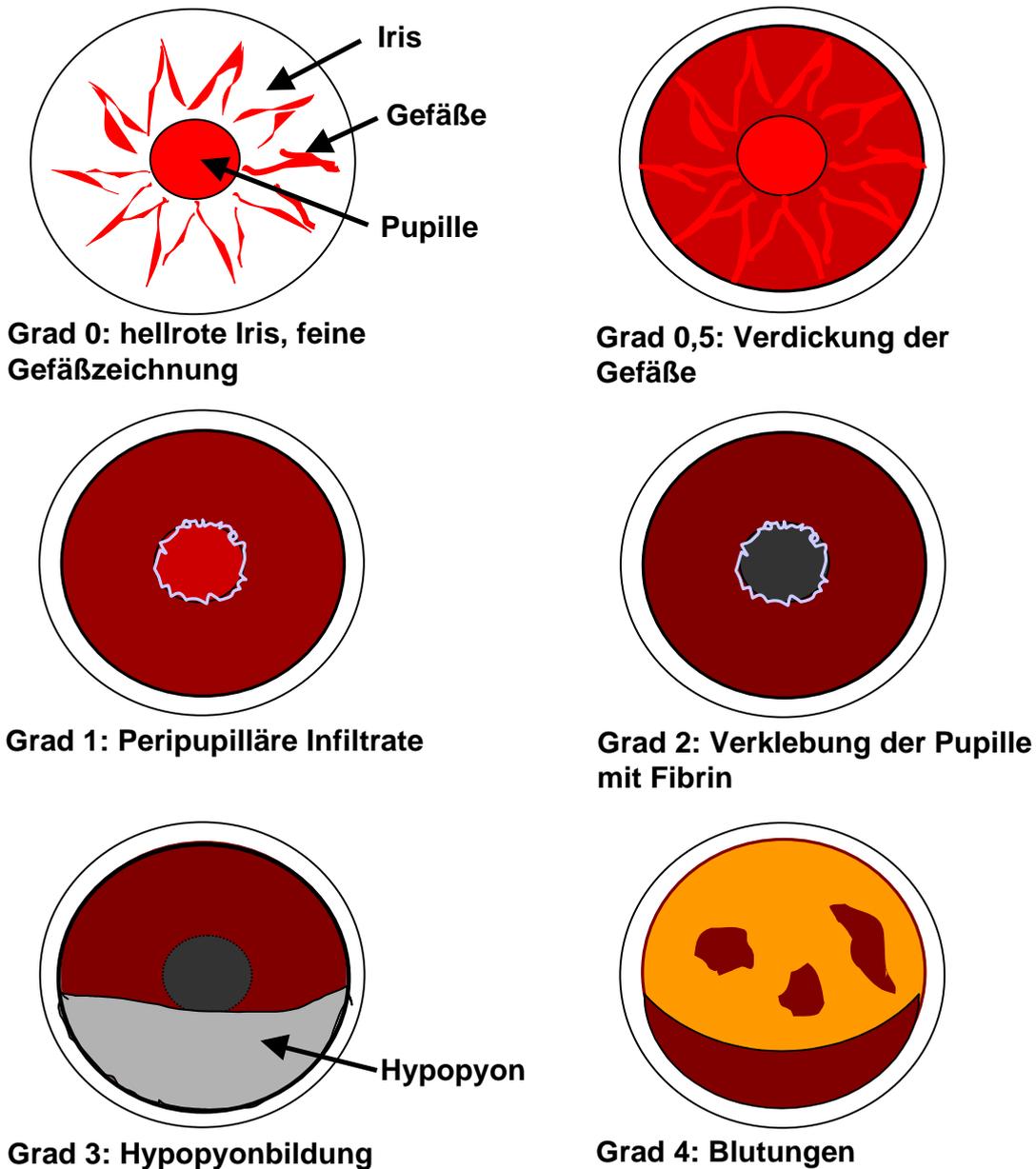


Abb. 7: Im Verlauf der EAU wandern immer mehr Entzündungszellen in das Auge ein. Exsudate von Leukozyten präzipitieren und bilden ein Hypopyon (steriles Leukozytensediment) in der Augenvorderkammer. Das Hypopyon kann letztendlich die gesamte Augenvorderkammer ausfüllen. Bei sehr schweren Uveitisverläufen treten unter Umständen Blutungen auf (vgl. Grad 4).

3. Histologie

3.1 Anfertigung der Gefrierschnitte

Den durch CO₂ getöteten Ratten wurden die Augen nach Durchtrennung der Konjunktiven, der Muskeln und des Nervus opticus entnommen. Die herausgelösten Bulbi wurden auf Korkplättchen platziert, mit Ausrichtung der Sehachse parallel zur Oberfläche. Nach Einbettung in OCT-Tissue-tec-Medium wurden die Augen in Methylbutan bei -70°C schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Mit einem Gefriermikrotom wurden Schnitte von 8-10 µm Dicke angefertigt. Zu beachten war, dass bei der Innentemperatur des Gerätes -20° bis -15°C, sowie bei der Temperatur des Messers -15°C nicht überschritten wurden. Es wurden zur vollständigen Darstellung der verschiedenen Gewebeschichten bevorzugt Schnitte aus der äquatorialen Region der Augen ausgewählt.

3.2 Herstellung der histologischen Präparate

Zur besseren Haftung der Cryoschnitte wurden Objektträger mit Poly-L-Lysin (MG 150 000 – 300 000) beschichtet.

Mattrand-Objektträger wurden zum Entfetten 5 min lang in frisches Aceton getaucht, danach ca. 15 Minuten getrocknet und anschließend 20 Minuten lang in Poly-L-Lysin Lösung (25 µg/ml H₂O dest.) inkubiert. Nach abschließender Trocknung können diese Objektträger bei 4°C über einen Zeitraum von mehreren Monaten gelagert werden.

Der Mattrand der Objektträger dient der dauerhaften Beschriftung der Präparate mit Bleistift, die sich bei der späteren Fixierung mit Aceton nicht ablösen noch die Präparate verfärben kann.

Um Fehldeutungen durch Artefakte vorzubeugen, wurden jeweils drei Gefrierschnitte des gleichen Auges auf einen Objektträger aufgebracht. In ungefärbtem Zustand können die Präparate bei 4°C ca. 2 Wochen, bei -70°C über Jahre gelagert werden.

3.3 Färbung der Präparate mit Hämatoxylin

Um die histologischen Präparate nach den Kriterien von de Smet (siehe 3.4) zu graduieren erfolgte eine Färbung der Gefrierschnitte mit Hämatoxylin.

Die histologischen Präparate, einsortiert in spezielle Glasstände, wurden zur Fixierung 15 Minuten in Küvetten mit eiskaltem Aceton gegeben, welche zur Kühlung zusätzlich auf Eis standen.

Nach einer Trocknungsphase von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Glasstände mit den fixierten Schnitten 2 Minuten in Hämatoxylinlösung getaucht und der überschüssige Farbstoff anschließend durch wiederholtes Eintauchen in frisches Leitungswasser entfernt.

Danach wurden die Gewebeschnitte 10 Minuten in Leitungswasser inkubiert, bevor sie in Kayser`s Glyceringelatine eingebettet wurden.

Diese konnte, nach Erwärmen in der Mikrowelle verflüssigt, auf die Präparate aufgetropft werden. Abschließend wurden vorsichtig die Deckgläser aufgelegt und die histologischen Präparate nach Erstarrung der Gelatine am Lichtmikroskop ausgewertet.

Saure Hämalaunlösung (Reagenz nach P. Mayer/Romeis 648, aus der Apotheke des Klinikums der LMU):

Hämatoxylin	1,0 g
Natriumjodat	0,2 g
Kalialaun 12 H ₂ O	50,0 g
Chloralhydrat	50,0 g
Zitronensäure (kristallin)	1,0 g
Gereinigtes Wasser	1000 ml

3.4 Histologische Graduierung

Eine EAU führt bei der Lewis-Ratte zu einer zellulären Infiltration mit Destruktion der Uvea. Da bei der Ratte die klinische Untersuchung nur eine Beurteilung des vorderen Augenabschnittes bzw. der Iris zulässt, ist sie bezüglich des Geschehens in der Retina wenig aussagekräftig. Um den hinteren Augenabschnitt, insbesondere Netzhaut und Ziliarkörper, befunden zu können, müssen histologische Schnitte angefertigt, gefärbt und nach folgenden Kriterien graduiert werden (de Smet et al., 1993):

- Grad 0: Keine Anzeichen von Entzündung.
- Grad 0,5: Minimale Entzündungszeichen; Architektur der Retina weitgehend intakt. Minimale zelluläre Infiltration in der Photorezeptorschicht.
- Grad 1: Zerstörung der Photorezeptorschicht in $> \frac{1}{4}$ der Retina. Fokale Bereiche der Zerstörung mit deutlichem Ausfall der Photorezeptoren. Retinale perivaskuläre Infiltration und monozytäre Infiltration in den Glaskörper.
- Grad 2: Läsionen in mehr als $\frac{1}{4}$ der Retina, bis zur äußeren Körnerschicht reichend. Kleine exsudative Netzhautablösungen. Granulombildung in der Uvea und Retina. Retinale Vaskulitis mit seröser Netzhautablösung und Verlust von Photorezeptoren.
- Grad 3: Läsionen in mehr als $\frac{1}{4}$ der Retina, die bis zur inneren Körnerschicht reichen. Verlust der retinalen Struktur, große exsudative Netzhautablösungen, mäßige bis große Zahl von Zellen im Glaskörper. Bildung von Dalen-Fuchs-Knoten und Entstehung von subretinalen Neovaskularisationen.
- Grad 4: Völlige Zerstörung der retinalen Architektur in mehr als $\frac{1}{4}$ der Retina.

Beispiele für die verschiedenen Stadien der Uveitis in der histologischen Graduierung:

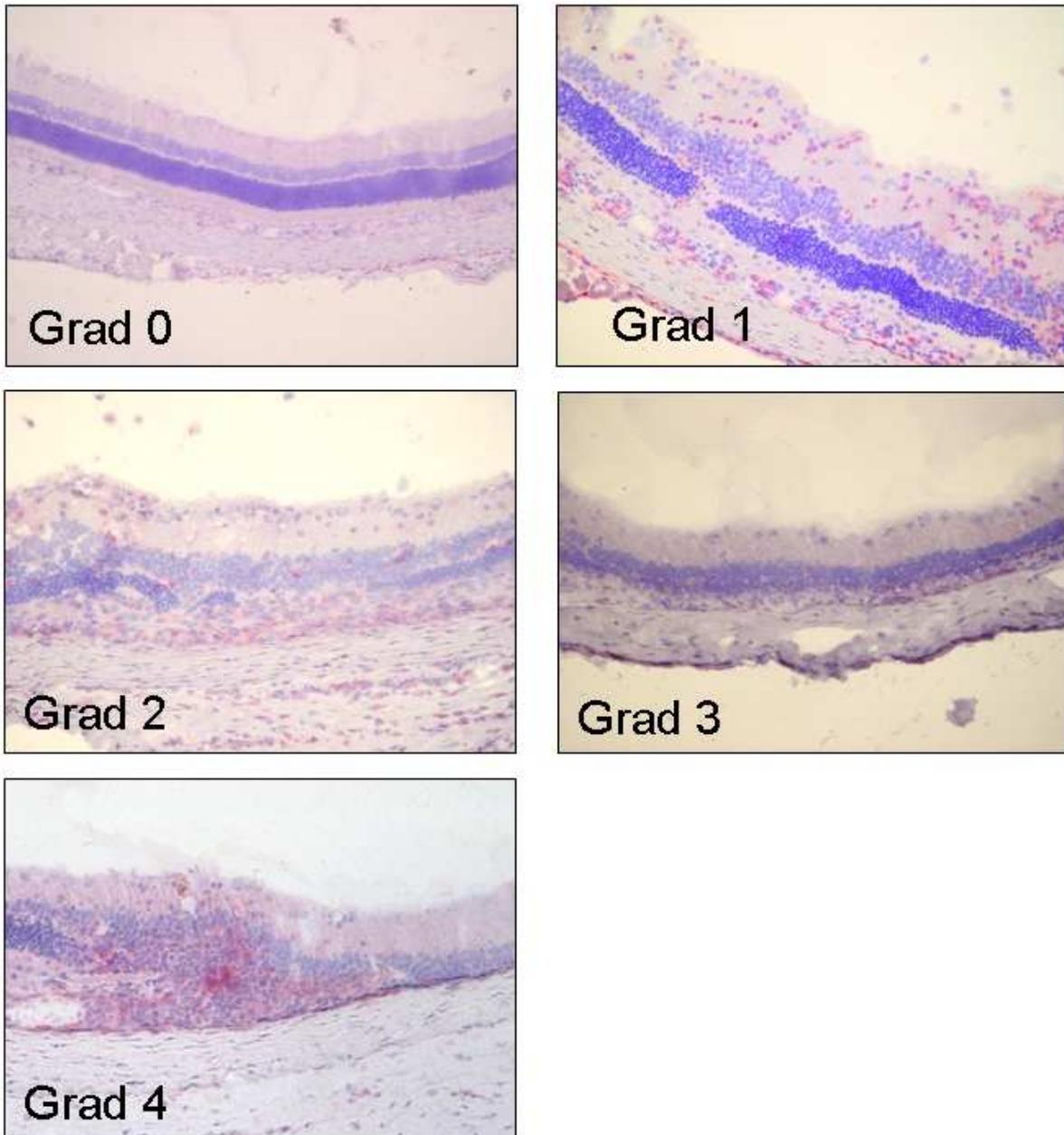


Abb. 8: Histologische Graduierung nach de Smet et al. (1993): Exemplarisch sind fünf Präparate mit retinalen Destruktionen entsprechend Grad 0 bis 4 dargestellt.

3.5 Immunhistochemische Färbung:

3.5.1 Indirekte immunhistochemische Färbung:

Um die auf den histologischen Präparaten vorhandenen Entzündungszellen besser charakterisieren zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung können die eingewanderten Zellen durch den Nachweis spezifischer Oberflächenmoleküle (z.B. T-Zell-Rezeptor, CD8) identifiziert werden. Die spezifischen Oberflächenmoleküle werden dabei durch sogenannte Primärantikörper gebunden. Als Primärantikörper wurden Maus-monoklonale Antikörper gegen Oberflächenmarker auf Rattenlymphozyten verwendet. Prinzip der immunhistochemischen Färbung siehe untenstehende Abbildung.

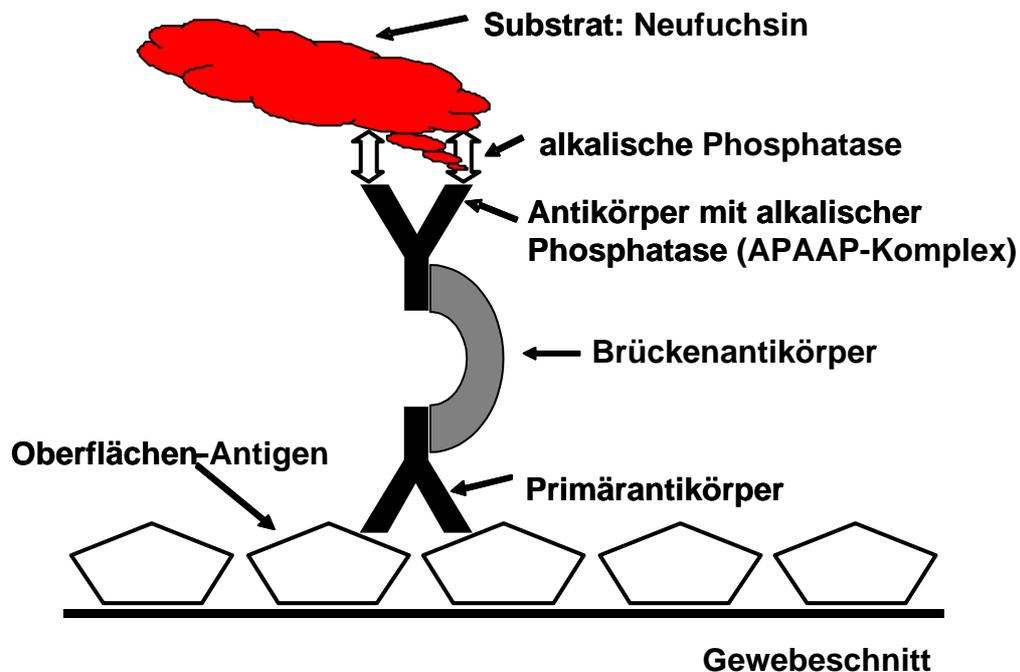


Abb. 9: Der Primärantikörper bindet spezifisch das entsprechende Oberflächenantigen (ED1, CD8, TCR) und wird durch einen Brückenantikörper mit dem APAAP-Komplex (Antikörper komplexiert mit alkalischer Phosphatase) verbunden. Die alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes setzt schließlich das dazugegebene Substrat (Neufuchsin) in unlösliche, farbige Derivate um, welche die entsprechenden Oberflächenantigene durch Rotfärbung sichtbar machen.

B. Material und Methoden

1. Die Primärantikörper (Maus-monoklonale Antikörper) wurden in Waschpuffer (0,05 M Tris, 0,14 M NaCl, pH 7,6) mit 1% FCS verdünnt (ED1 1:500, anti-CD4 1:1000), und ca. 120 µl von der jeweiligen Antikörperlösung vorsichtig auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Nach 1 Stunde Inkubationszeit in feuchten Kammern wurden die Objektträger 2 x 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Dies erfolgte auf einem Kippschüttler.
2. Der Brückenantikörper wurde 1:80 mit Waschpuffer/1% FCS verdünnt, auf die Objektträger pipettiert und 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Präparate wie im vorhergehenden Schritt 2 x 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen.
3. Der APAAP-Komplex wurde 1:50 mit Waschpuffer/1% FCS verdünnt. Die Präparate wurden wie oben beschrieben für 45 Minuten mit der Antikörperlösung inkubiert und danach 2 x 5 Minuten gewaschen.
4. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 30 - 45 Minuten mit dem Substrat (Neufuchsin) inkubiert. Das Substrat wird dabei von der alkalischen Phosphatase enzymatisch in einen unlöslichen roten Farbstoff umgesetzt. Da diese Reaktion lichtempfindlich ist, fand die Inkubation unter Lichtabschluß statt. Danach wurden die Objektträger 3 Minuten in Waschpuffer und anschließend 3 Minuten in Leitungswasser gewaschen.
5. Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Einbettung der Präparate in Kaiser`s Glyceringelatine wurden durchgeführt wie unter 3.3 beschrieben.

Substrat (Neufuchsin):

Zur Herstellung der Substratlösung mußten zunächst drei Substratkomponenten (Lösung A,B,C) frisch angesetzt werden, welche erst unmittelbar vor dem Gebrauch gemischt wurden, da so erhaltene Substratlösung nur kurze Zeit haltbar ist.

Lösung A:

Lösung A setzt sich aus 145 ml Entwicklungspuffer und 50 ml AMPD-Lösung zusammen, ausreichend für eine 200 ml Küvette.

Entwicklungspuffer

6,4 g Tris

8,7 g NaCl

ad 1000ml H₂O, pH 8,7

B. Material und Methoden

AMPD-Levamisol-Lösung

0,2 M 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propanediol:

21 g AMPD ad 1000 ml H₂O dest.

75 mg Levamisol wurden in 50 ml 0,2 M AMPD-Lösung gelöst.

Lösung B:

Lösung B setzt sich aus 1 ml Natrium-Nitrit-Lösung und 420 µl Neufuchsin-Lösung zusammen (für 200 ml Küvette).

1 ml 4% Natrium-Nitrit-Lösung:

40 mg Na-Nitrit ad 1000 µl H₂O dest.

Diese Lösung muss unmittelbar vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

5% Neufuchsin-Stammlösung

5 g Neufuchsin

100 ml 2 N HCL

Zur Herstellung von Lösung B lässt man 1 ml Natrium-Nitrit-Lösung 1 Minute mit 420 µl Neufuchsin-Lösung reagieren

Lösung C (Naphtol):

500 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat in 6,051 ml Dimethylformamid lösen, bei -20 C lagern.

Die Substratlösung muss unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden. Zuerst wurde Lösung B (1,42 ml) zur Lösung A (195 ml) gegeben und anschließend mit Lösung C (1,25 ml) vermischt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe 10%iger HCl auf 8,7 eingestellt. Die fertige Lösung mußte unter Rühren 2 Minuten reagieren, mögliche Präzipitate anschließend durch Filtration durch einen Faltenfilter entfernt werden, bevor die Gewebeschnitte darin inkubiert wurden.

B. Material und Methoden

3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung standen fluoreszenzmarkierte Antikörper zur Verfügung (CD4-PE und CD8-PE [Phycoerythrin], Biozol/Eching). Es wurde eine ED1/CD8-Doppelfärbung durchgeführt. Die Antikörperlösungen (Konzentration: 100 µg/ml) wurden in PBS-Medium mit 1%igem FCS Anteil in einem Verhältnis von von 1:20 (ED1) bzw. 1:80 (CD8) verdünnt und anschließend die jeweiligen Antikörperverdünnungen in einem Verhältnis von 1:1 zusammengegeben (Endkonzentrationen: 2,5 µg/ml ED1, 0,625 µg/ml CD8).

Die so erhalten Lösung wurde vorsichtig auf die Präparate aufgegeben (ca. 90 µl pro Objektträger). Die Inkubationszeit betrug 35 Minuten und fand unter Lichtabschluß statt. Danach wurden die Objektträger 10 Minuten mit PBS gewaschen, bevor die Präparate in Mounting Medium (Immunfluore TM, ICN Biochemicals) eingebettet werden konnten. Bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurden die Präparate unter Lichtabschluss aufbewahrt.

4. Zellkultur

Etablierung spezifischer T-Zelllinien:

Um antigenspezifische T-Zellen zu erhalten, wurden zunächst Ratten mit dem entsprechenden Antigen immunisiert und nach 10 bis 12 Tagen die drainierenden Lymphknoten (popliteal, inguinal, paraaortal) entnommen. Einzelzellsuspensionen der Lymphknotenzellen wurden in Kulturmedium (RPMI 1640 mit Zusätzen: Pen/Strep/Glutamin und 2 % Rattenserum) in einer Zelldichte von 5×10^6 /ml aufgenommen und mit dem jeweiligen Ag (10 µg/ml spezifisches Peptid) stimuliert (Wildner & Diedrichs-Möhring, 2003).

Zur Herstellung einer möglichst zahlreichen spezifischen Lymphozytenpopulation hat sich ein zyklisches Schema einer dreitägigen Stimulationsphase, gefolgt von einer viertägigen Expansionsphase bewährt.

Zur Expansion wurden die T-Zellen zusammen mit 10 % spleen conditioned medium (SCM = Kulturüberstand von mitogenstimulierten Milzzellen), 5 % FCS und IL-7/IL-18 (5 – 10 ng/ml) 4 Tage lang inkubiert.

Dieser Zyklus konnte drei- bis viermal wiederholt werden, bevor die Zellen abstarben bzw. nicht mehr mit Antigen stimuliert werden konnten. Allerdings mussten zu Beginn jeder weiteren Stimulationsphase bestrahlte (10 Gy) antigenpräsentierende Zellen (Ratten-Thymozyten) im Verhältnis 10:1 (Thymozyten:Lymphozyten) zugegeben werden. Nach Ag-Stimulation können die Zellen für einen adoptiven Transfer verwendet werden.

C. Ergebnisse

1. Aktive Immunisierung mit Peptiden

Um den Einfluss von MCP-1/CCL-2 auf den Verlauf der experimentellen Autoimmun-Uveitis zu untersuchen, wurde den Tieren nach Induktion der EAU [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 verabreicht. Zur Induktion der EAU wurden die Ratten mit zwei unterschiedliche Antigene - PDSAg bzw. R14 – immunisiert.

In den einzelnen Versuchen wurde sowohl die Applikationsform des [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 (orale bzw. intraperitoneale Verabreichung), als auch der Zeitpunkt der [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Behandlung (Induktionsphase: Tag 0 bis 6 bzw. efferente Phase der Immunantwort: Tag 6 bis 13) variiert. Die Dosierung betrug jeweils 500 µg [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1/kg KG.

1.1 Immunisierung mit PDSAg

Schematischer Verlauf der EAU nach aktiver Immunisierung mit PDSAg und Applikation von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1:

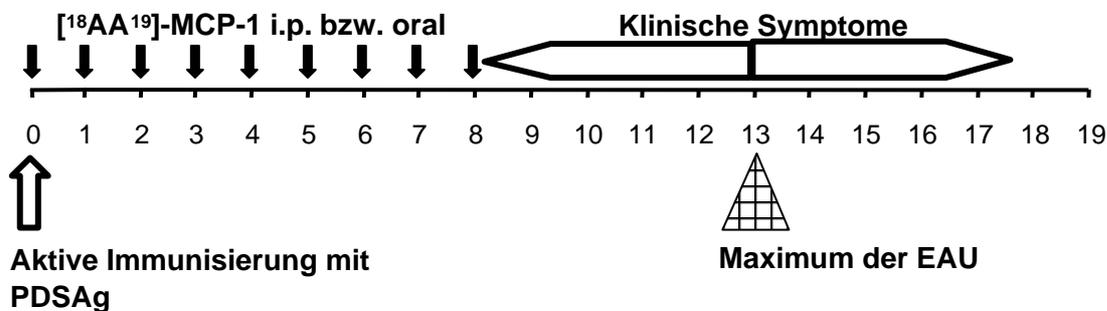


Abb. 10: Die Immunisierung mit PDSAg erfolgte an Tag 0, woran sich eine tägliche [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung anschloss. Die Behandlung wurde beendet, sobald die ersten klinischen Zeichen einer Uveitis in der Kontrollgruppe zu sehen waren.

1.1.1 Intraperitoneale Injektion von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1

Lewis-Ratten im Alter von 7 bzw. 11 Wochen wurden mit PDSA_g in CFA immunisiert. Ab dem Tag der Immunisierung wurde [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 (500 µg/kg KG, gelöst in 0,5 ml PBS) täglich i.p. verabreicht, bis die ersten klinischen Zeichen der Uveitis zu sehen waren. Einer Kontrollgruppe wurde über den gleichen Zeitraum 0,5 ml PBS i.p. injiziert.

Der klinische Verlauf wurde dokumentiert, die Ergebnisse sind in Abb.11 festgehalten. Dargestellt ist die zu dem jeweiligen Untersuchungszeitpunkt für jede Gruppe ermittelte durchschnittliche Uveitisintensität pro Auge.

In der mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 behandelten Gruppe kam es zu einem tendenziell früheren Krankheitsbeginn, sowie einer etwas stärkeren Uveitisintensität bis zum 11. Tag nach Immunisierung (Abb.11).

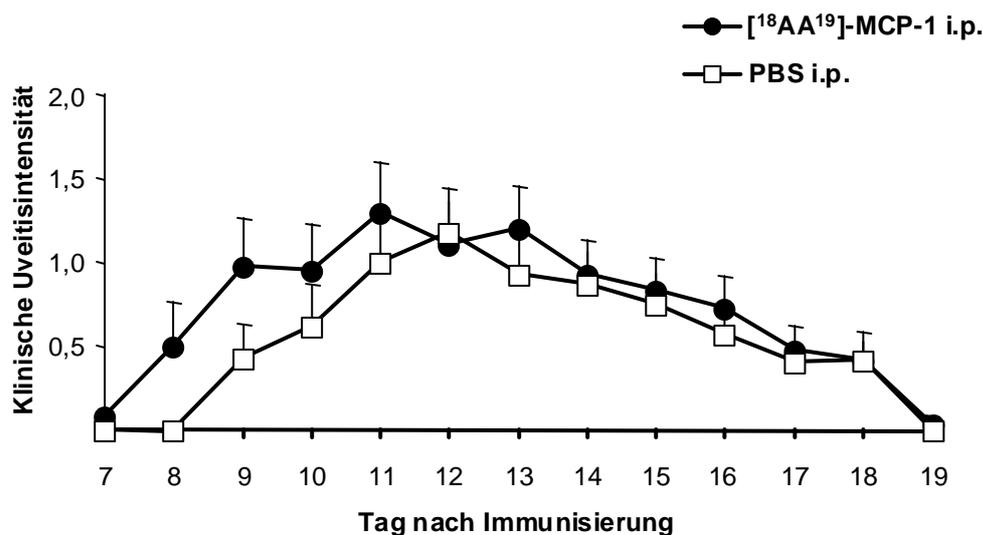


Abb. 11: Klinischer Verlauf der EAU nach Immunisierung mit PDSA_g und [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 i.p.- bzw. PBS i.p.Injektion: Kombination zweier unabhängiger Experimente, gezeigt ist die durchschnittliche klinische Uveitisintensität aller Augen einer Gruppe pro Tag + SE; [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 i.p. (500 µg/kg KG) Tag 0 - 6 (n = 12 Augen) bzw. 0 - 8 (n = 8 Augen); die Kontrollgruppe wurde über den gleichen Zeitraum mit PBS behandelt.

C. Ergebnisse

Für die Auswertung wurden für jedes Auge die maximale klinische Graduierung und die histologische Graduierung kombiniert. Aus dem jeweiligen Wert wurde die durchschnittliche Uveitisintensität pro Auge und Gruppe berechnet und in ein Diagramm übertragen. Die Abb. 12 zeigt die durchschnittliche maximale klinische Uveitisintensität, sowie die durchschnittliche histologische Uveitisintensität und die additive Graduierung der klinischen und histologischen Uveitisintensität.

Dabei ergaben sich für die [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 behandelte Gruppe durchgehend höhere Werte als für die mit PBS i.p. behandelte Kontrollgruppe, wobei lediglich bei der histologischen Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen der [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1- und der PBS-behandelten Gruppe ($p = 0,0346$) festgestellt wurde.

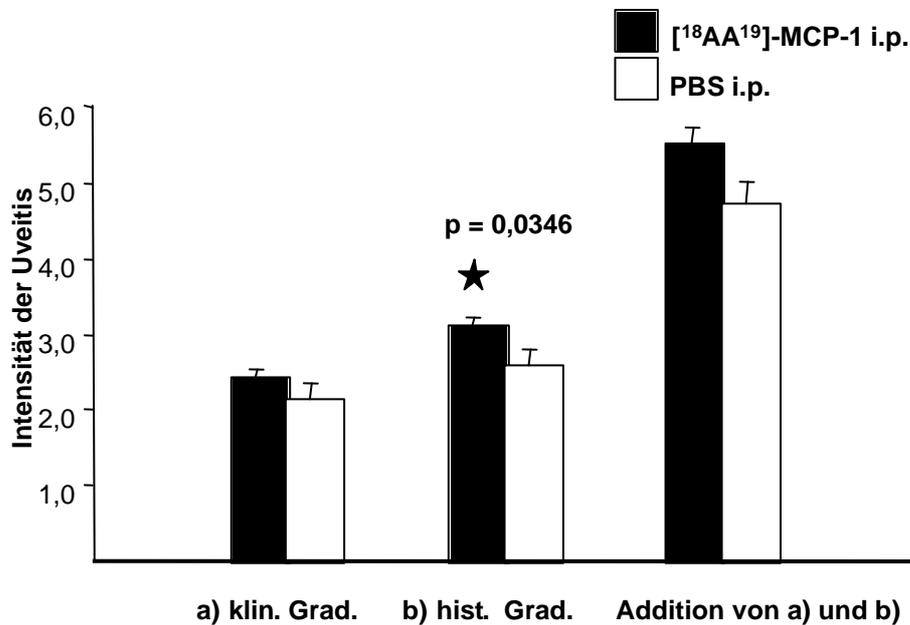


Abb. 12: Einfluss von [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 i.p.-Injektion (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) auf die aktiv mit PDSAg induzierte EAU: Kombination zweier unabhängiger Versuche; gezeigt ist die durchschnittliche maximale Uveitisintensität pro Auge + SE: [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 i.p. Tag 0 - 6 ($n = 12$ Augen) bzw. Tag 0 - 8 ($n = 8$ Augen); die Kontrollgruppe erhielt PBS.

C. Ergebnisse

1.1.2 Orale Verabreichung von [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 (Dosierung 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG)

Um die Wirksamkeit der oralen Applikation von [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 zu testen, wurden Ratten im Alter von 10 Wochen jeweils 500 μg [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 /kg KG in 0,5 ml PBS mittels einer Schlundsonde intragastral verabreicht.

Analog zu dem vorhergegangenen Versuch sind die Ergebnisse in Abb. 13 und Abb. 14 zusammengefasst.

Bei der klinischen Verlaufskontrolle wurde sowohl bei der [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1- als auch der PBS-gefütterten Gruppe ein sehr ähnlicher Verlauf festgestellt, mit einer nahezu identischen maximalen Uveitisintensität an Tag 14 (Abb. 13).

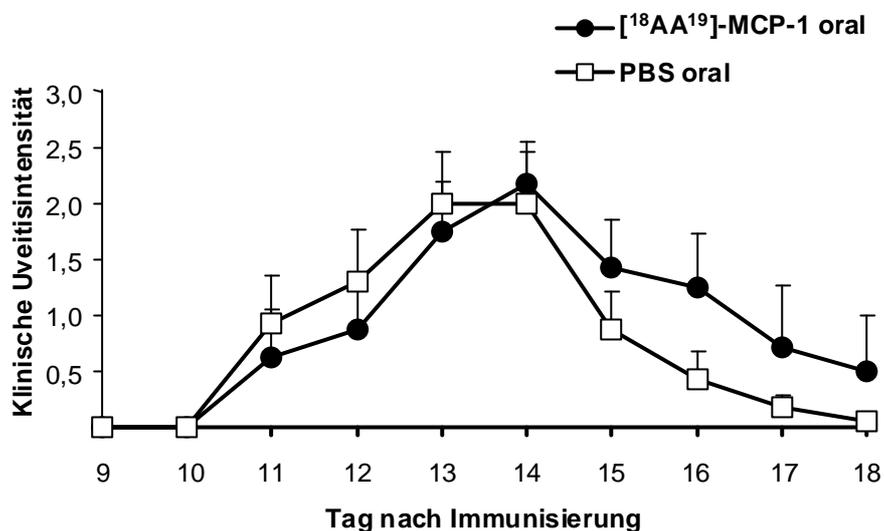


Abb. 13: Klinischer Verlauf der EAU nach Immunisierung mit PDSA_g und oraler [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1-Gabe (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG): Die Gavage erfolgte jeweils täglich von Tag 0 - 8, dargestellt ist die tägliche durchschnittliche klinische Uveitisintensität aller Augen pro Gruppe + SE; n = 8 Augen

C. Ergebnisse

Auch die histologische und kombinierte klinische und histologische Graduierung (Abb. 14) zeigte keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Daher wurde in folgenden Versuchen (Ausnahme: orale Toleranzinduktion) auf die orale Verabreichung von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 verzichtet.

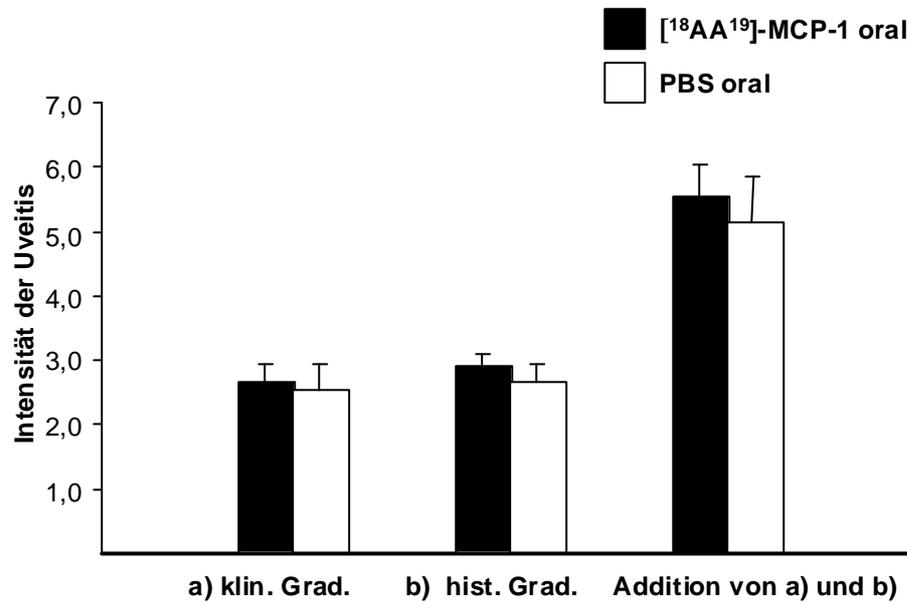


Abb. 14: Einfluss oraler [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Gabe (500 µg/kg KG) auf die aktiv induzierte PDSAg-Uveitis: Die Gavage erfolgte jeweils von Tag 0 - 8, dargestellt ist die durchschnittliche maximale Uveitisintensität aller Augen + SE; n = 8 Augen

1.2 Immunisierung mit R14

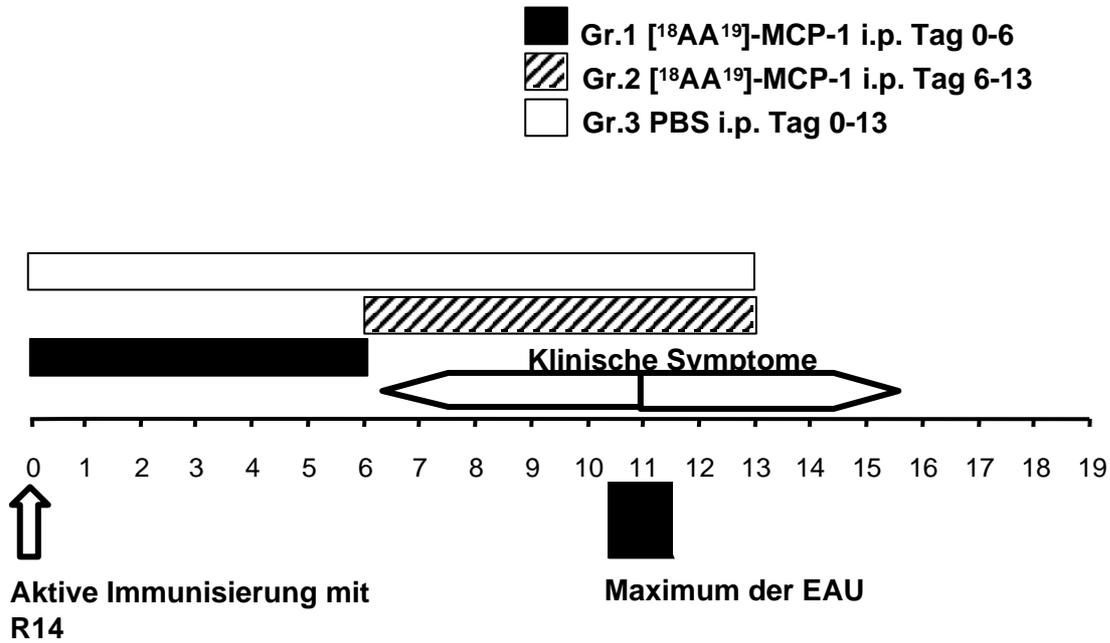


Abb. 15: Schematischer Verlauf der EAU nach Immunisierung mit R14. Um den Einfluss von [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 auf die unterschiedlichen Phasen der Immunantwort zu untersuchen, wurde [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 über verschiedene Zeiträume appliziert. Gr.1 wurde von Tag 0 - 6 (afferente Phase) und Gr.2 von Tag 6 - 13 (efferente Phase) mit [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt PBS i.p. von Tag 0 - 13.

C. Ergebnisse

Um die Wirkung des CCL-Antagonisten [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 auf die antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen (Tag 0 - 6) bzw. deren Infiltration ins Auge und die Rekrutierung von Entzündungszellen (Tag 6 - 13) zu untersuchen, erhielten die Ratten während der angegebenen Zeit täglich [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 in einer Dosis von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG.

Bei der Verlaufskontrolle zeigte sich bei beiden Gruppen mit [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1-Applikation eine Verstärkung der Entzündungsreaktion im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei Gruppe 1 ([$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 Tag 0-6) zusätzlich eine verlängerte Krankheitsdauer aufwies (Abb. 16).

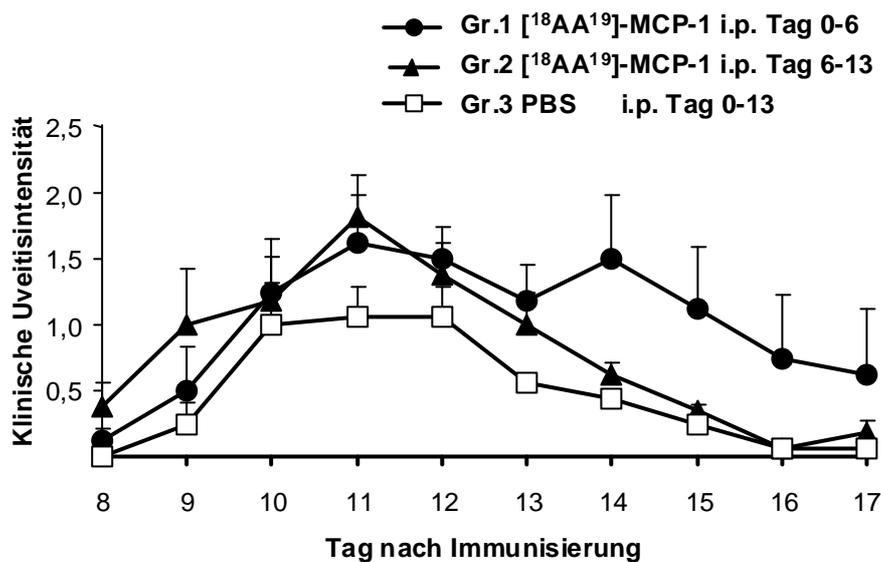


Abb. 16: Klinischer Verlauf der EAU nach Immunisierung mit R-14 und [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 i.p. Gabe: Gezeigt ist die durchschnittliche klinische Uveitisintensität aller Augen + SE; n = 8 Augen; die Kontrollgruppe erhielt PBS i.p. von Tag 0 – 13.

C. Ergebnisse

In der endgültigen Auswertung, welche sowohl die klinische als auch histologische Graduierung umfasst, wurde die klinische Beobachtung bestätigt. Die intraperitoneale Injektion von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 von Tag 0 bis 6 führte zu einer signifikanten Verstärkung der Uveitis.

Die stärkste Uveitis gemäß klinischer und histologischer Graduierung wies dabei die Gruppe 1 mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 i.p. Gabe während der Induktionsphase (Tag 0 - 6) auf. Die histologische Graduierung und die kombinierte Auswertung ergaben im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöhte Erkrankungsmerkmale. In der klinischen Untersuchung war die Verstärkung der Uveitis weniger deutlich sichtbar.

Auch in der Gruppe 2 ([¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 von Tag 6 - 13) zeigte sich tendenziell eine Verstärkung der Entzündungsreaktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Werte siehe Abb. 17).

Die Unterschiede zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2, sowie der Gruppe 2 und der Kontrollgruppe, waren in den einzelnen Graduierungen nicht signifikant (siehe Abb. 17).

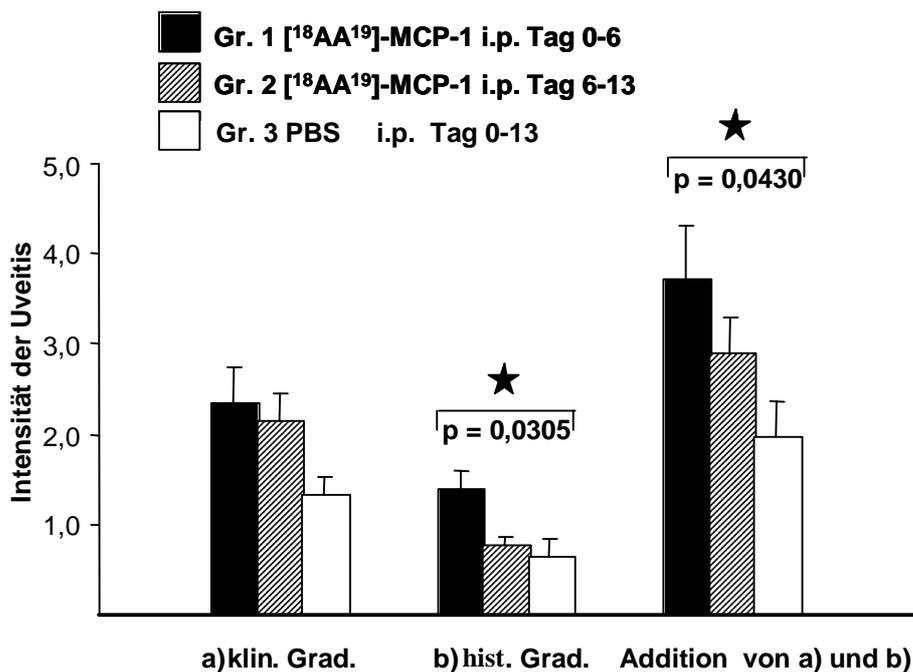


Abb. 17: Aktive Immunisierung mit R14 und Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 i.p.-Gabe (500 µg/kg KG) auf die aktiv mit R14 induzierte EAU: Dargestellt ist die durchschnittliche maximale Uveitisintensität aller Augen + SE; n = 8 Augen

2. Adoptiver Transfer aktivierter T-Zellen

2.1 Transfer PDSAg-spezifischer T-Zellen

Schematischer Verlauf der EAU nach Transfer antigenaktivierter, PDSAg-spezifischer T-Zellen:

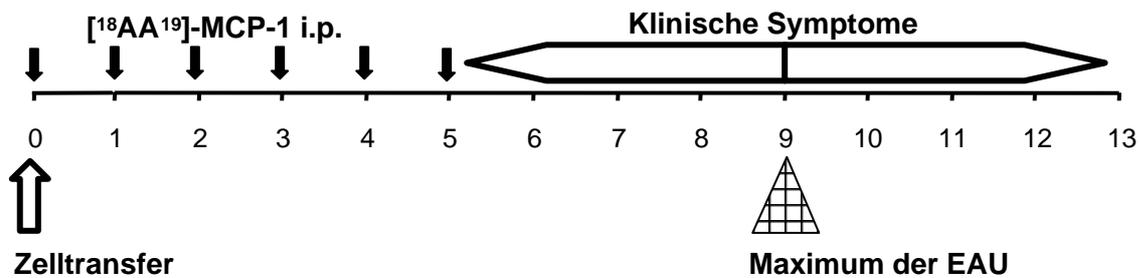


Abb. 18: Der Transfer der Zellen erfolgte an Tag 0, woran sich eine tägliche Behandlung mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 anschloss. Die Behandlung wurde beendet, sobald die ersten klinischen Zeichen einer Uveitis zu sehen waren.

2.1.1 [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 i.p. in einer Dosierung von 500 µg/kg KG

Zur Induktion der EAU wurden Lewis-Ratten im Alter von ca. 7 Wochen $2,5 \times 10^6$ Antigen-aktivierte PDSAg-spezifische T-Zellen pro Tier in die Peritonealhöhle injiziert. Anschließend wurde täglich [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 i.p. in einer Dosierung von jeweils 500 µg/kg KG injiziert (gelöst in 0,5 ml PBS). Die Behandlung wurde am Tag 5 beendet, die ersten klinischen Zeichen einer Uveitis waren am Tag 6 zu sehen (siehe Abb. 19). Einer Kontrollgruppe wurde über den gleichen Zeitraum 0,5 ml PBS i.p. verabreicht.

In Abb. 19 ist die durchschnittliche Uveitisintensität pro Auge und Gruppe im Krankheitsverlauf zu sehen.

In der [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 behandelten Gruppe wurde eine deutlich stärkere Entzündungsreaktion als in der Kontrollgruppe festgestellt. Die Gruppe mit der Chemokingabe zeigte, abgesehen von einem späteren Beginn der Krankheit, über den gesamten Beobachtungszeitraum eine stärkere klinische Symptomatik (Abb. 19).

C. Ergebnisse

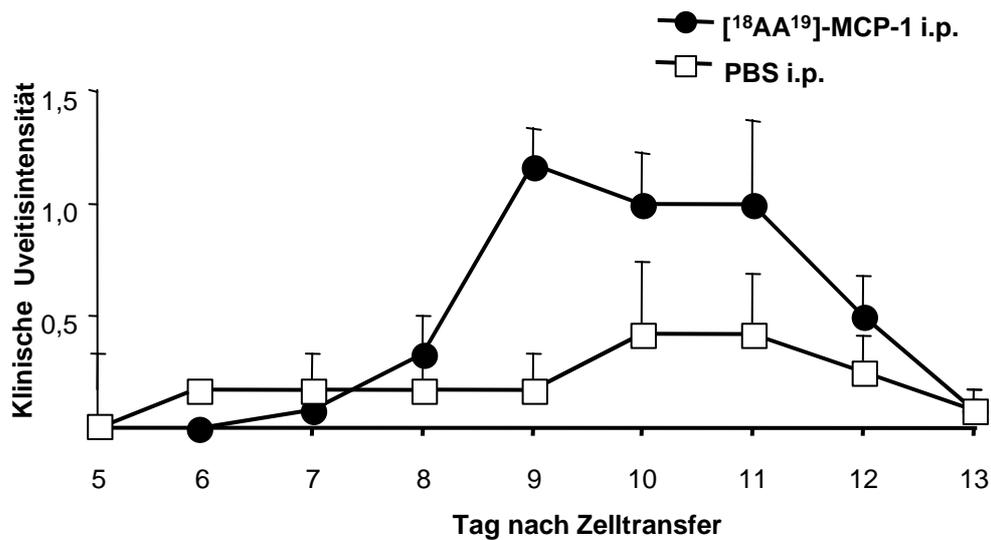


Abb. 19: Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf die durch adoptiver Transfer PDSAg-spezifischer T-Zellen induzierte EAU: [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung i.p.(500 µg/kg KG) von Tag 0 - 5 nach Zelltransfer ($2,5 \times 10^6$ Zellen/Ratte); n = 6 Augen; dargestellt ist der klinische Verlauf als durchschnittliche Uveitisintensität aller Augen + SE

In der abschließenden histologischen Auswertung konnten, der klinischen Beobachtung entsprechend, in der Gruppe mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Behandlung vermehrt retinale Destruktionen nachgewiesen werden (Abb. 20).

Die Summengraduierung ergab eine deutlich verstärkte, aber nicht signifikante Uveitisintensität im vorderen (klinische Graduierung) wie auch im hinteren Augenabschnitt (histologische Graduierung).

C. Ergebnisse

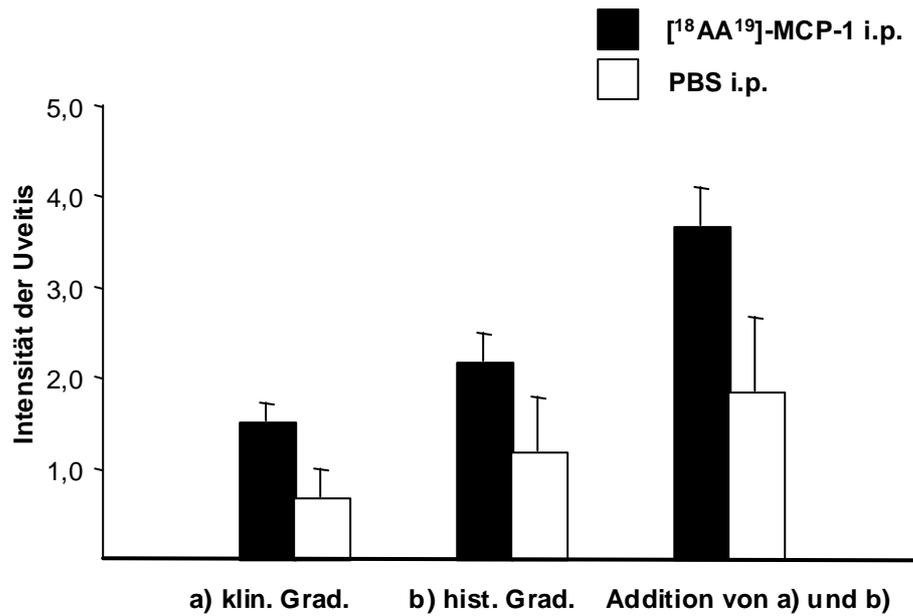


Abb. 20: Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 i.p.-Behandlung (500 mg/kg KG) auf die durch adoptiven Transfer PDSAg-spezifischer T-Zellen induzierte EAU: [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Behandlung i.p. von Tag 0 - 5 nach Zelltransfer ($2,5 \times 10^6$ Zellen/Ratte); n = 6 Augen; dargestellt ist die durchschnittliche maximale Uveitisintensität aller Augen + SE

2.1.2 Vergleich verschiedener [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Dosierungen nach Induktion der EAU durch adoptiven Transfer PDSAg-spezifischer T-Zellen

Um eine eventuelle Dosisabhängigkeit bezüglich der Wirkung des verabreichten [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 zu untersuchen, wurden in dem folgenden Versuch zwei verschiedene Dosierungen des [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 gewählt. Die Gruppe 1 erhielt eine Dosierung von 800 µg/kg KG, die Gruppe 2 eine Dosierung von 400 µg/kg KG. Das Alter der Ratten betrug 7 Wochen.

Die Applikation erfolgte täglich ab dem Tag des Transfers und wurde am Tag 4, bei Diagnose der ersten Entzündungszeichen, beendet. Die Gruppe 3 wurde als Kontrollgruppe über den gleichen Zeitraum mit PBS behandelt.

Die Gruppen mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Behandlungen zeigten tendenziell eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufes.

Wie in Abb. 21 zu sehen ist, zeigten die [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 behandelten Gruppen eine verstärkte Entzündung. In der Gruppe 1 war dabei die stärkste Uveitisintensität zu beobachten. Um die Art und Menge der jeweiligen Entzündungszellen mittels einer immunhistochemischen Färbung identifizieren zu können wurde der Versuch bereits am Maximum der klinischen Entzündungszeichen (Tag 8) beendet, da mit dem Abklingen der klinischen Symptomatik in der Regel auch die beteiligten Entzündungszellen das Organ verlassen.

C. Ergebnisse

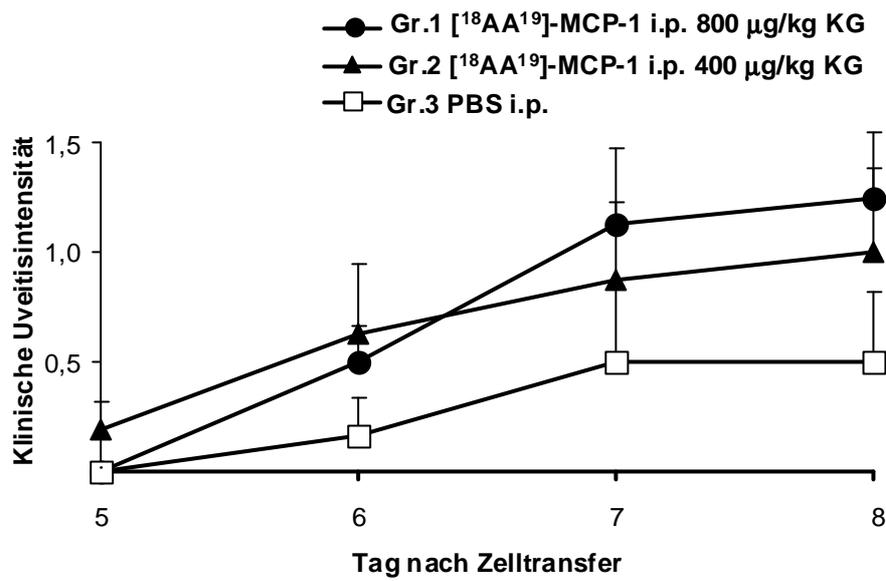


Abb. 21: Einfluss von $[^{18}\text{AA}^{19}]$ -MCP-1 i.p.-Behandlung auf die durch adoptiven Transfer PDSAg-spezifischer T-Zellen ($2,5 \times 10^6$ Zellen/Ratte) induzierte EAU: Gr.1 und Gr.2 $[^{18}\text{AA}^{19}]$ -MCP-1 i.p. in angegebener Dosierung Tag 0 - 4; n = 6 Augen; dargestellt ist der klinische Verlauf als durchschnittliche Uveitisintensität aller Augen

C. Ergebnisse

In Abb. 22 sind die Ergebnisse wieder in einem Säulendiagramm zusammengefasst. Die tendenziell höchsten Werte zeigte die Gruppe 1 mit der höheren [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 Dosierung, während die Gruppe 2 (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) sich kaum von der Kontrollgruppe unterschied.

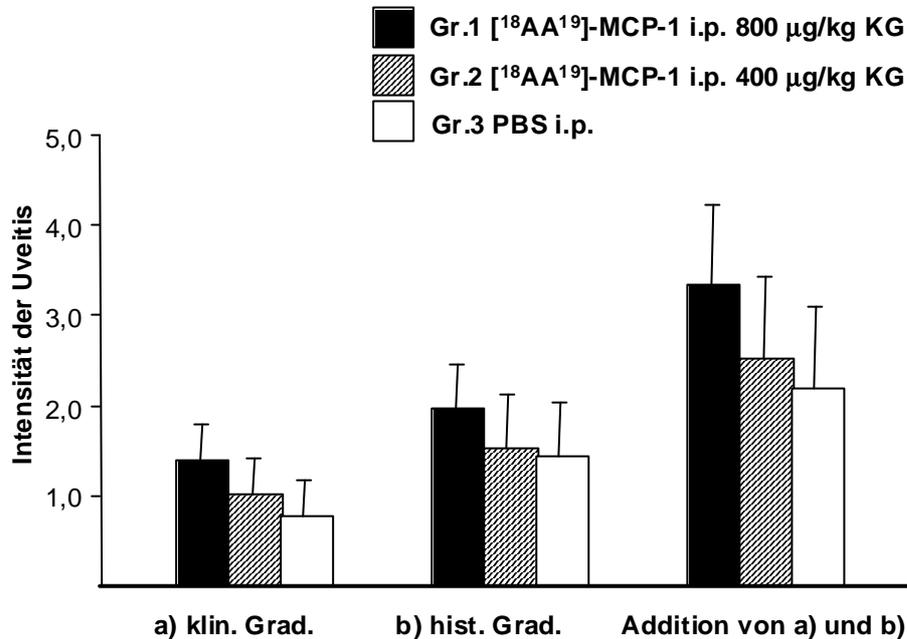


Abb. 22: Einfluss von unterschiedlichen [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1-Dosierungen auf die durch adoptiven Transfer PDSAg-spezifischer T-Zellen induzierten EAU: Gr. 1: 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG; Gr. 2: 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG; intraperitoneale [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 Applikation von Tag 0 – 4; Transfer von $2,5 \times 10^6$ Zellen/Ratte; $n = 6$ Augen; dargestellt ist die durchschnittliche maximale Uveitisintensität aller Augen + SE

2.2 Transfer R14 spezifischer T-Zellen

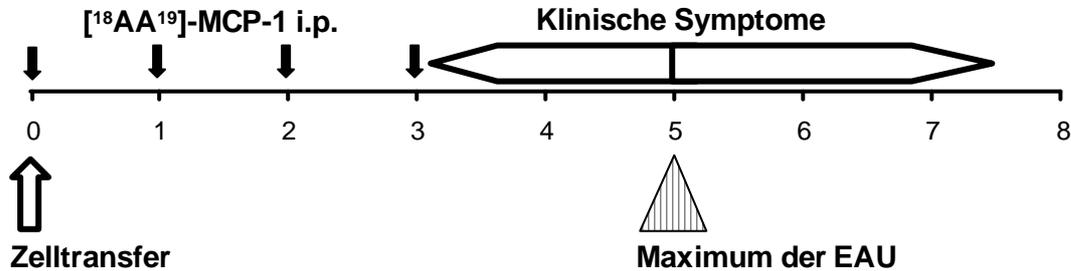


Abb. 23: Schematischer Ablauf der EAU nach Transfer antigenaktivierter R14-spezifischer T-Zellen und Applikation von $[^{18}\text{AA}^{19}]$ -MCP-1 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG)

Es handelt sich hierbei um einen Parallelversuch zum adoptiven Transfer mit PDSAg-spezifischen T-Zellen. Zur Induktion der EAU wurden den Lewis-Ratten (Alter: 6 - 10 Wochen) $2,5 \times 10^6$ Antigen-aktivierte R14-spezifische T-Zellen pro Tier i.p. injiziert. Um die Wirkung des $[^{18}\text{AA}^{19}]$ -MCP-1 auf die Einwanderung der aktivierten spezifischen Lymphozyten in das Auge zu untersuchen, wurden die Tiere von Tag 0 bis 3 mit $[^{18}\text{AA}^{19}]$ -MCP-1 i.p. in einer Dosierung von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG behandelt (gelöst in 0,5 ml PBS). Eine Kontrollgruppe erhielt über den gleichen Zeitraum 0,5 ml PBS i.p. Es wurden zwei Versuche zusammengefasst, der eine Versuch wurde bereits am Maximum der EAU (5. Tag nach Zelltransfer) beendet, um die histologischen Präparate immunhistochemisch färben und auswerten zu können.

C. Ergebnisse

Die klinischen Symptome waren in der Gruppe mit [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 Behandlung über den gesamten Krankheitsverlauf deutlich geringer ausgeprägt (Abb. 24), im Gegensatz zu den vorhergegangenen Versuchen mit Transfer PDSAg-spezifischer T-Zellen (vgl. Abb. 19, Gruppe mit [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1-Behandlung).

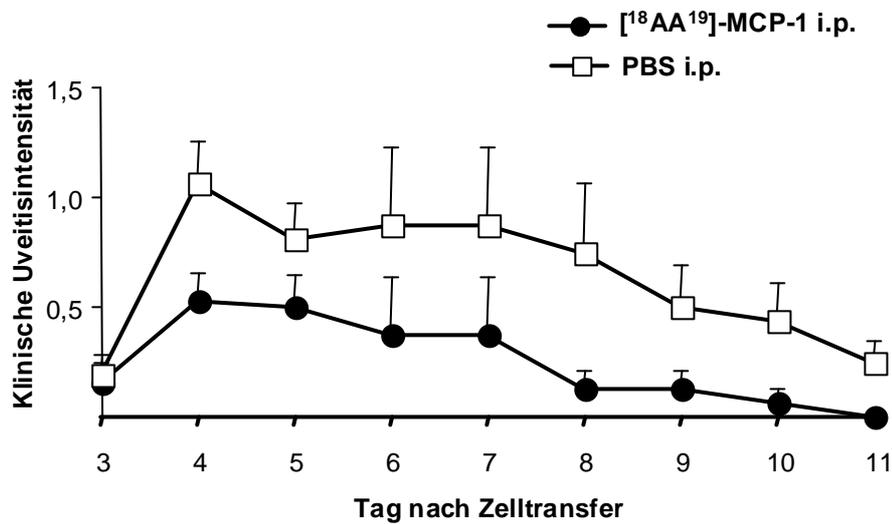


Abb. 24: Einfluss von [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 i.p.-Gabe (500 mg/kg KG, Tag 0 – 3) auf die durch adoptiven Transfer R14-spezifischer T-Zellen (ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen/Ratte) induzierten EAU: Dargestellt ist der klinische Verlauf als durchschnittliche Uveitisintensität aller Augen + SE; n = 16 (bis Tag 5), n = 8 (ab Tag 6)

C. Ergebnisse

Die Ergebnisse in Abb. 25 wurden durch die abschließende Auswertung der maximalen klinischen Uveitisintensität, sowie der histologischen Graduierung der Augen bestätigt. Sowohl die klinische als auch die histologische Graduierung zeigten eine Abschwächung der Entzündungsintensität durch die Gabe von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 (siehe Abb.25).

Nach Addition der klinischen und histologischen Graduierung konnte für die Gruppe mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung ein signifikant niedrigerer Wert festgestellt werden ($p = 0,045$).

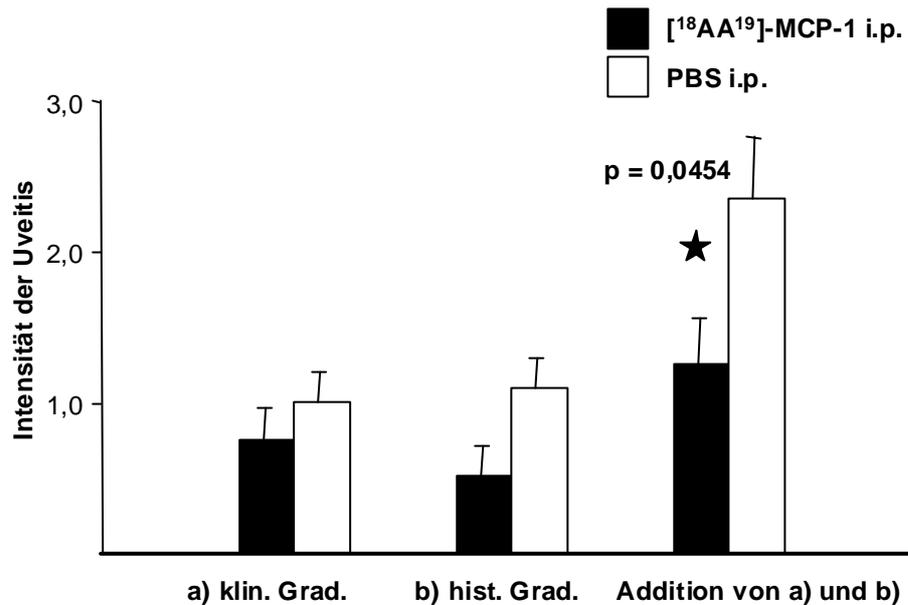


Abb. 25: Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 i.p. (500 mg/kg KG) auf die durch adoptiven Transfer R14 spezifischer T-Zellen induzierte EAU: Dargestellt ist die maximale durchschnittliche Uveitisintensität aller Augen + SE; [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 i.p. Tag 0 - 3; n = 16

3. Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf die orale Toleranzinduktion (OTI)

Zur Induktion der oralen Toleranz wurde das entsprechende Tolerogen (Peptid-R14) dreimal jeden zweiten Tag (Tag -6, -4 und -2 vor Immunisierung) in einer Dosierung von 200 µg, gelöst in 0,5 ml PBS, mittels einer Schlundsonde intragastral appliziert.

Um den Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf die Induktion der Toleranz zu untersuchen, erhielten die Versuchstiere begleitend zur oralen Toleranzinduktion eine tägliche Behandlung mit 500 µg/kg KG [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 von Tag -6 bis Tag -1 vor Immunisierung. Das [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 wurde einen Tag vor der Immunisierung abgesetzt, um ein unerwünschtes Interferieren der [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Behandlung mit der Uveitisinduktion zu verhindern. Somit konnte die Wirkung des [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf die orale Toleranzinduktion eingeschränkt werden (siehe Abb. 26).

Es wird angenommen, dass die orale Toleranzinduktion eine spezifische Leistung des GALT ist. Da die genauen Mechanismen der Antigen-Präsentation und Erkennung noch nicht bekannt sind, und für andere Chemokin-Derivate eine Wirkung nach oraler Gabe gezeigt wurde, wurde neben der intraperitonealen auch die orale Applikation des [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 durchgeführt.

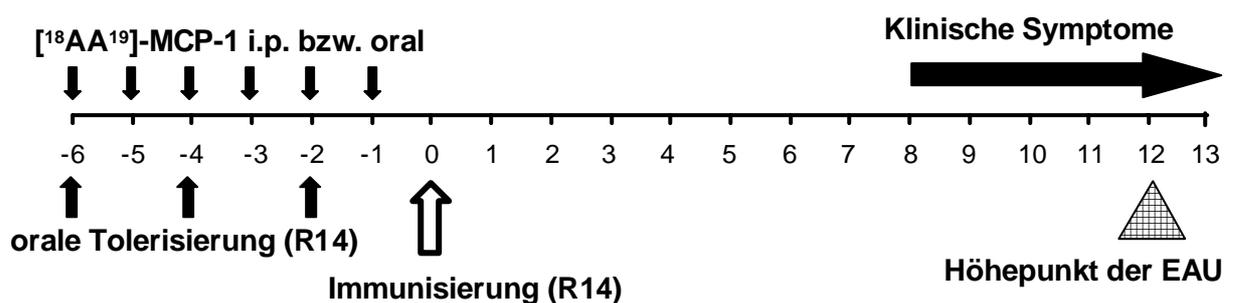


Abb. 26: Schematischer Verlauf der oralen Toleranzinduktion (OTI), der [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung und der nachfolgenden aktiven Immunisierung mit R14: Dargestellt ist der zeitliche Verlauf in Tagen, aktive Immunisierung an Tag 0; orale Toleranzinduktion mit 200 µg R14/Ratte/Tag, [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 täglich, in einer Dosierung von 500 µg/kg KG

3.1 Intraperitoneale Gabe von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1

Durch die Verabreichung des Tolerogens kam es, wie erwartet, zu einer Abschwächung der Entzündungsreaktion (vgl. Gr.2 in Abb. 27). Die intragastrale Applikation von PBS alleine (Gr.3) bzw. mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 (Gr.4) diente als Kontrolle, weil damit eine vergleichbare Streßbelastung (tägliche Gavage) ohne Toleranzinduktion erzielt werden konnte. Die Gruppen 3 und 4 wiesen einen ähnlichen Krankheitsverlauf auf (vgl. Abb.27) und zeigten, dass die frühe Gabe von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 vor der Immunisierung und Uveitisinduktion keinen Einfluss auf die Uveitis hat.

Die i.p.-Applikation von 500µg/kg KG [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 (gelöst in 0,5 ml PBS; Alter der Ratten ca. 6 Wochen) während der Phase der oralen Tolerisierung (Tag 6 bis Tag 1 vor Immunisierung) zeigte im klinischen Verlauf eine tendenzielle Verstärkung der oralen Toleranz. Die Erkrankung trat in der [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 behandelten Gruppe später auf und zeigte zudem ein deutlich niedrigeres Maximum am Höhepunkt des Krankheitsverlaufes (vgl. Abb. 27, Gr.1).

Die alleinige Gabe des [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 ohne Tolerogen (Gr.3) zeigte keinen Einfluss auf den Verlauf der EAU.

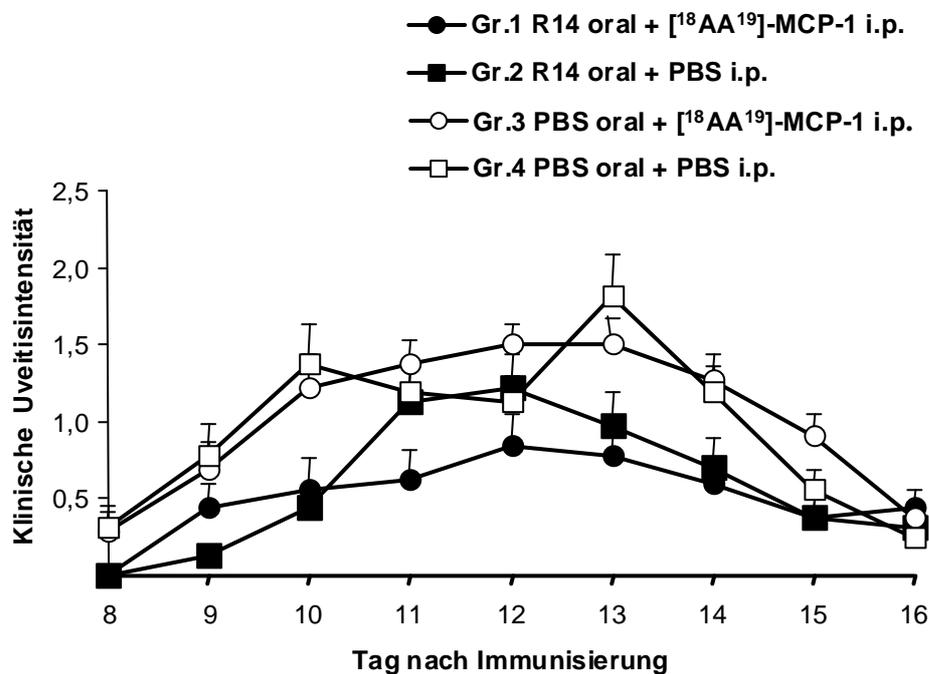


Abb. 27: Einfluss der intraperitonealen [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Gabe (500 µg/kg KG) während der oralen Toleranzinduktion mit R14 auf die aktiv induzierte R14-Uveitis: Dargestellt ist der klinische Verlauf als durchschnittliche Uveitisintensität aller Augen + SE; n = 8 Augen

C. Ergebnisse

Die oral tolerisierten Gruppen (Gr. 1 und Gr. 2) wiesen in der histologischen Graduierung und bei Kombination der einzelnen Graduierungen signifikant niedrigere Werte als die entsprechenden Kontrollgruppen (Gr. 3 und Gr. 4) auf. Die [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1/R14 behandelte Gruppe war nicht unterschiedlich zur Gruppe, die nur mit R14 behandelt wurde.

Die zusätzliche i.p.-Applikation von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 während der oralen Tolerisierung führte zu einer geringen Zunahme der retinalen Destruktionen in der Gr. 1.

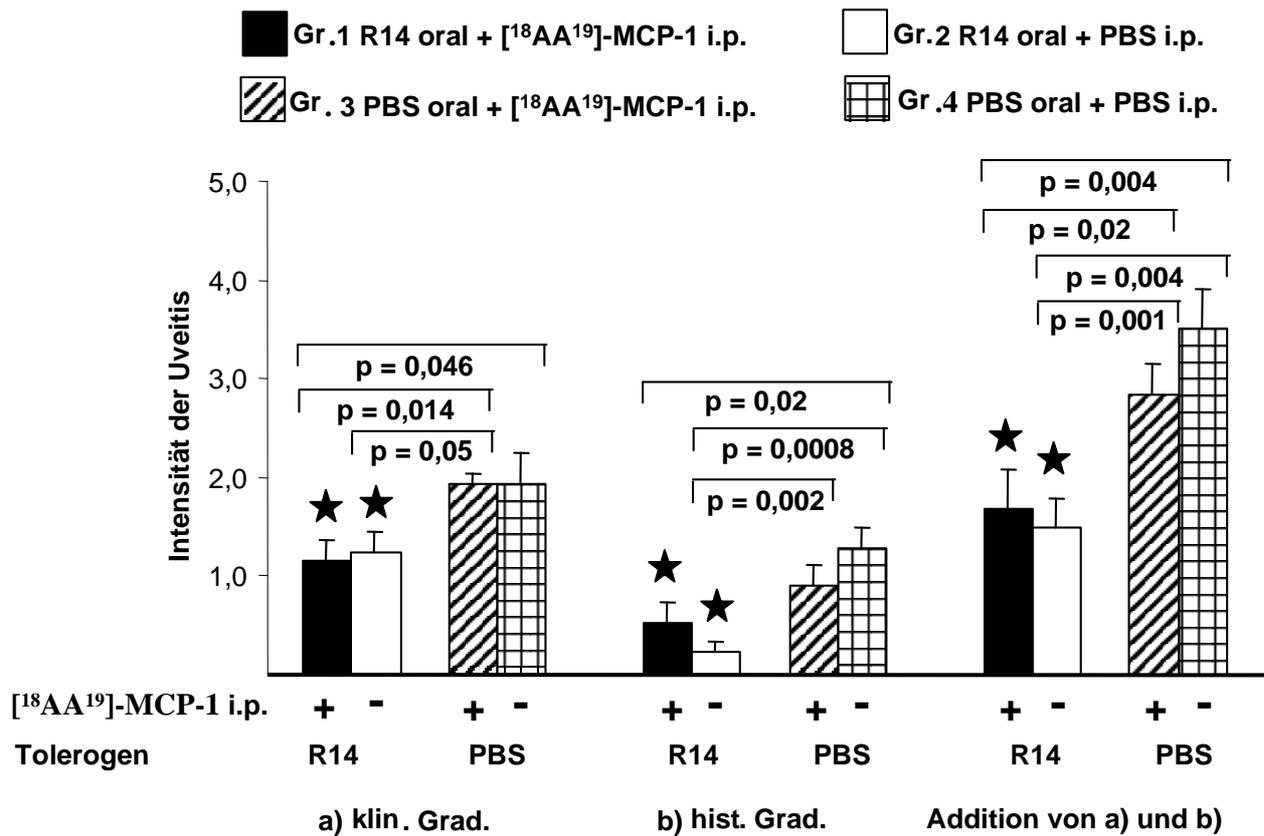


Abb. 28: Einfluss der intraperitonealen [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Gabe (500 µg/kg KG) während der oralen Toleranzinduktion mit R14 auf die aktiv induzierte R14-Uveitis: Dargestellt ist die durchschnittliche maximale Uveitisintensität aller Augen + SE; n = 8 Augen; Behandlungsschema siehe Abb. 26

3.2 Orale Gabe von [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1

Um den direkten Einfluss von [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 auf die OTI im Magen-Darm-Trakt zu untersuchen, wurde es auch oral in einer Dosierung von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG während der OTI verabreicht. Wie im vorherigen Versuch konnte auch hier die orale Verabreichung des Tolerogens die Entzündungsreaktion in der nachfolgend induzierten EAU abgeschwächen. Die Gruppen 1 und 2 wiesen im Verlauf eine geringere Uveitisintensität als die entsprechenden Kontrollgruppen (Gr. 3, Gr. 4) auf. Die Gruppen 2 und 4 mit der PBS i.p.-Behandlung fungierten auch in diesem Experiment als Kontrollgruppen, da kein Unterschied zwischen der oralen- und i.p.-Verabreichung des nicht tolerogenen PBS zu erwarten war. In der Gruppe mit zusätzlicher oraler Gabe von [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1 (Gr.1) konnte im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe (Gr. 2) kein Unterschied im Krankheitsverlauf festgestellt werden (siehe Abb. 29).

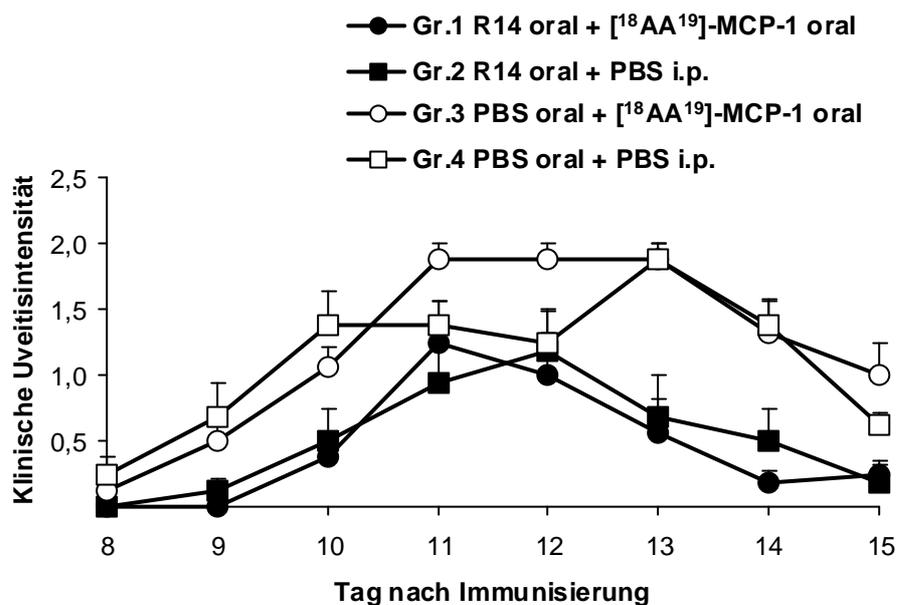


Abb. 29: Einfluss der oralen [$^{18}\text{AA}^{19}$]-MCP-1-Gabe (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) während der oralen Toleranzinduktion mit R14 auf die aktiv induzierte R14-Uveitis: Dargestellt ist der klinische Verlauf als durchschnittliche Uveitisintensität aller Augen + SE; n = 8 Augen

C. Ergebnisse

In der abschließenden Auswertung der klinischen und histologischen Graduierung war kein signifikanter Effekt der oralen [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung im Vergleich zur Gruppe, die nur oral tolerisiert wurde, feststellbar.

Die Werte der Gruppen 3 und 4 waren in der klinischen Graduierung identisch (SE ±0).

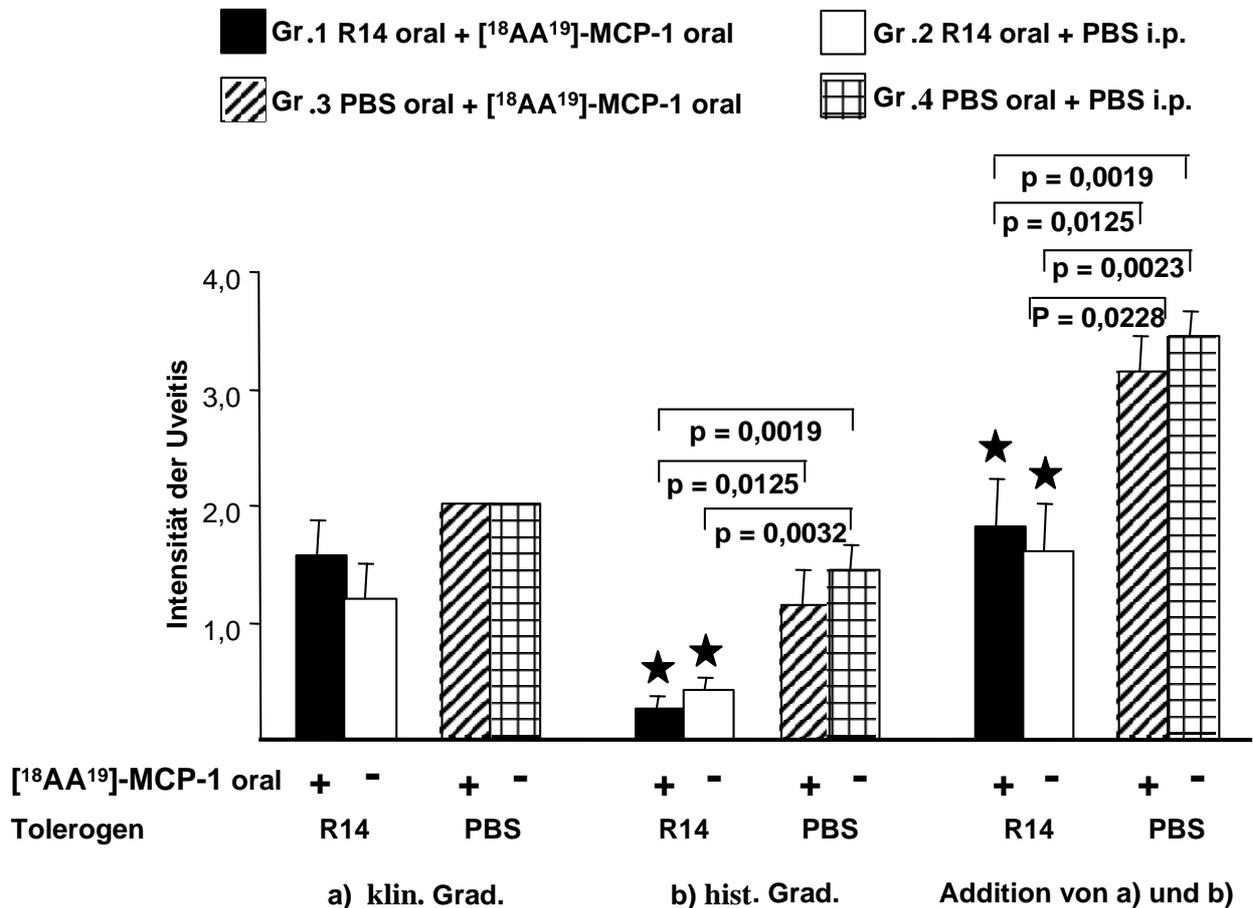


Abb. 30: Einfluss der oralen [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Gabe (500 µg/kg KG) während der oralen Toleranzinduktion mit R14 auf die aktiv induzierte R14-Uveitis: Dargestellt ist die maximale durchschnittliche Uveitisintensität aller Augen + SE; n = 8 Augen; Behandlungsschema siehe Abb. 26

4. Immunhistochemische Färbungen

Um die eingewanderten Entzündungszellen charakterisieren zu können und eine mögliche Inhibition der Monozyten-/Makrophagenrekrutierung durch die Behandlung mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 nachweisen zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung der histologischen Präparate durchgeführt. Um die infiltrierenden Entzündungszellen möglichst zahlreich und vollständig zu erfassen, wurde der Versuch (adoptiver Transfer mit PDSAg-spezifischen T-Zellen) bereits zum Zeitpunkt der maximalen klinischen Entzündungsaktivität beendet (vgl. Verlaufskurve in Abb. 20). Als Primär-AK wurden ED1 (Makrophagen), R73 ($\alpha\beta$ TCR+/T-Zellen) und Ox8 (CD8 positive Zellen) verwendet. Dabei konnten keine Unterschiede bezüglich des Infiltrationsmusters zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden. In der Anfärbung mit Ox8-AK waren CD8 positive Zellen mit typischer Makrophagenmorphologie nachweisbar. Zur Abklärung dieses Befundes wurde anschließend eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung durchgeführt (siehe 5. Immunfluoreszenzfärbung). In Abb. 32 sind repräsentative Präparate der jeweiligen Gruppe mit den verschiedenen Färbungen abgebildet.

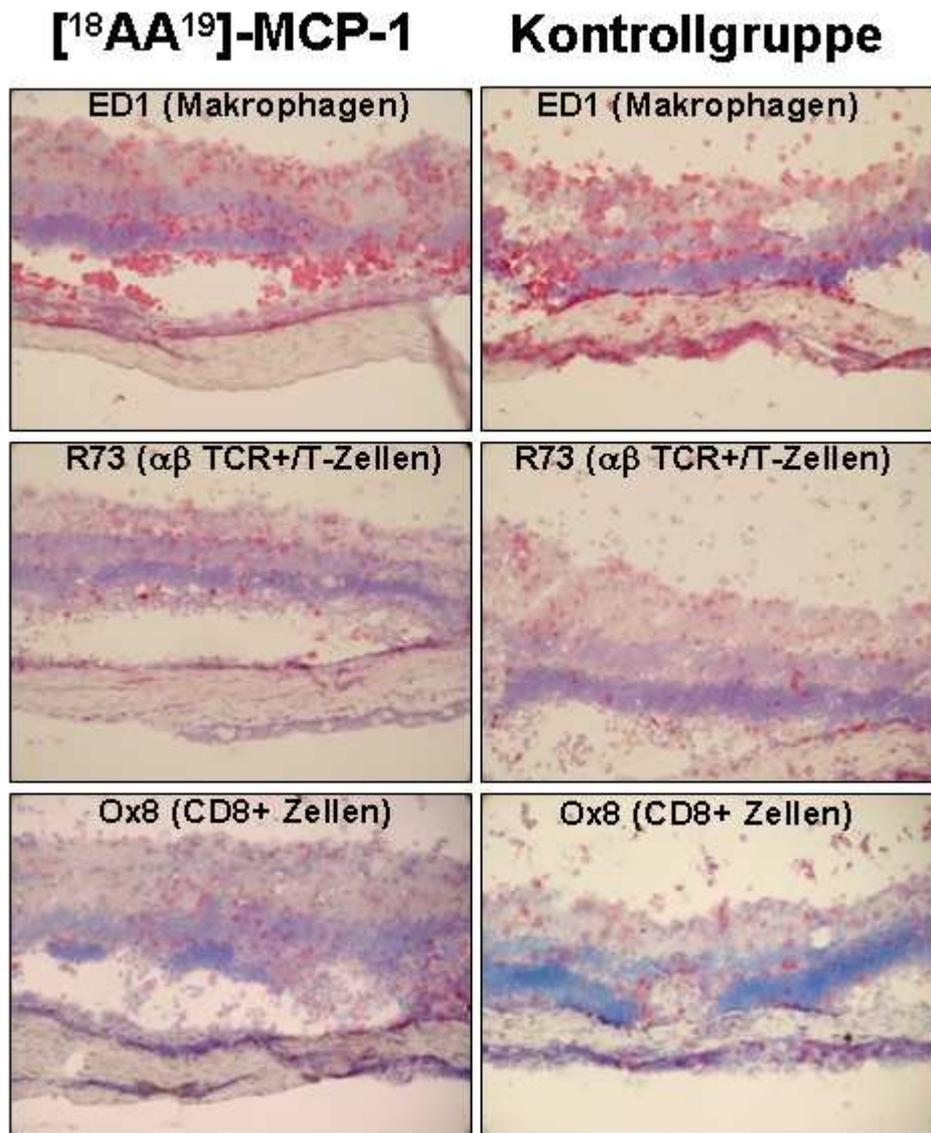


Abb. 31: Immunhistochemische Färbung (Adoptiver Transfer $2,5 \times 10^6$ Zellen/Ratte PDSAg-spezifischer T-Zellen): [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Behandlung i.p. (500 µg/kg KG) von Tag 0 - 5 nach Zelltransfer; kein Unterschied bezüglich des Infiltrationsmusters feststellbar; Nachweis von CD8 positiven Zellen mit typischer Makrophagenmorphologie

5. Immunfluoreszenzfärbung:

Nachdem sich in der immunhistochemischen Färbung CD8⁺ Zellen mit typischer Makrophagenmorphologie zeigen, wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit makrophagenspezifischen Antiörpern (ED1) und Antikörper gegen CD8 (Ox8) durchgeführt. Dabei konnten CD8⁺ Makrophagen nachgewiesen werden.

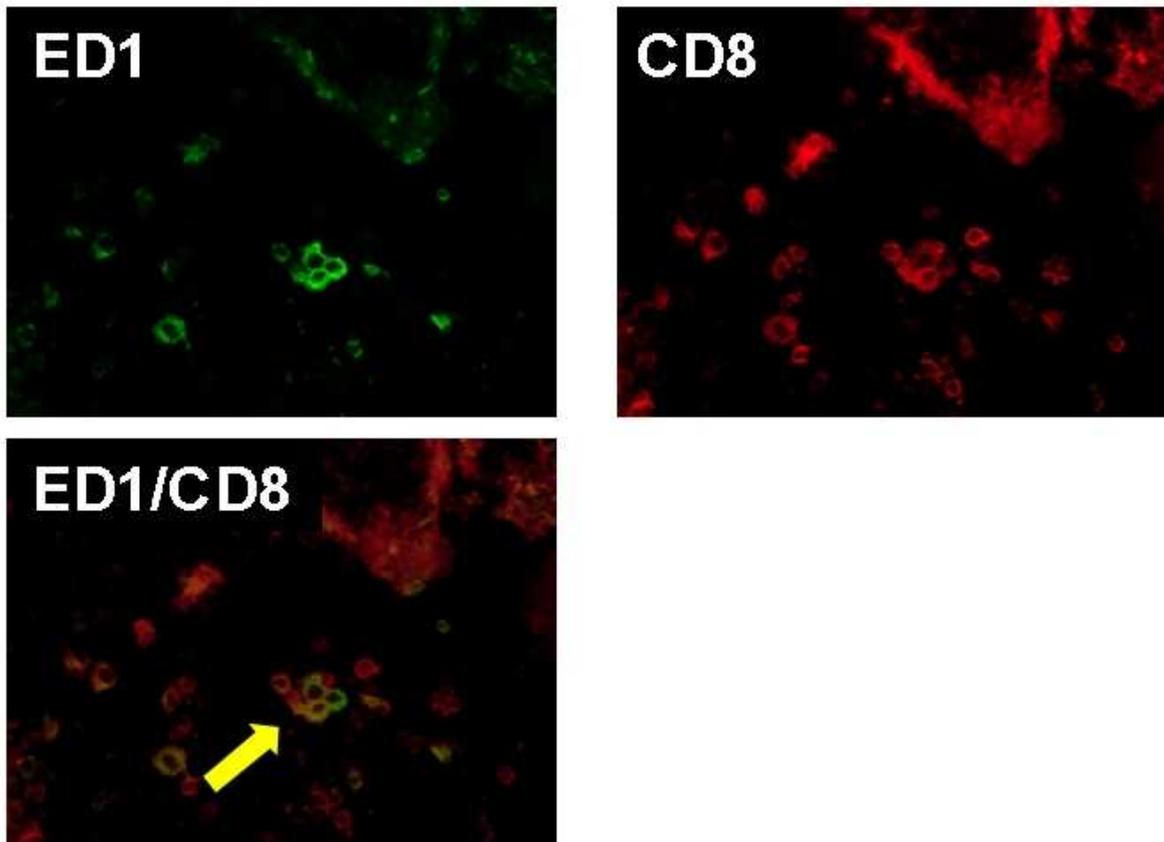


Abb. 32: Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis CD8 positiver Makrophagen: Adoptiver Transfer PDSAg-spezifischer T-Zellen ($2,5 \times 10^6$ Zellen/Ratte): [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1-Behandlung i.p. (500 µg/kg KG) von Tag 0 - 5 nach Zelltransfer, Nachweis von CD8-positiven Makrophagen (ein CD8⁺/CD 68⁺ Zelle ist exemplarisch mit einem gelben Pfeil markiert)

D. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von MCP-1/CCL-2 auf den Verlauf der experimentellen Autoimmunerkrankung bei der Lewis-Ratte mit Hilfe des modifizierten Chemokins [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 untersucht.

In der Vergangenheit wurde die Funktion von MCP-1/CCL-2 bereits bei etlichen Krankheitsmodellen untersucht. So spielt MCP-1/CCL-2 z.B. bei der (diabetischen) Atherosklerose, der rheumatoiden Arthritis und der Multiplen Sklerose eine wichtige Rolle bezüglich der Migration und Rekrutierung von Entzündungszellen (Rollins, 1996; Mine et al., 2006). Als Vergleich zur EAU wird oft die experimentelle Autoimmunenzephalitis (EAE) - ein Tiermodell für die Multiple Sklerose - herangezogen, da es sich, wie bei der EAU, um eine Th₁ vermittelte Krankheit handelt. Im Rahmen der EAE-Induktion durch Immunisierung mit MBP können die Lewis-Ratten auch eine anteriore Uveitis (AU) entwickeln. Bereits vor Beginn der klinischen Symptome kann MCP-1/CCL-2 in dem betroffenen Gewebe (ZNS, Auge) nachgewiesen werden. Damit könnte MCP-1/CCL-2 für die Einwanderung der Entzündungszellen zu Beginn der Immunreaktion mitverantwortlich sein (Adamus et al., 1997). Während des Krankheitsverlaufs korreliert die lokale MCP-1/CCL-2-Synthese mit der Entzündungsintensität (Adamus et al., 2001), und scheint damit den Krankheitsverlauf maßgeblich zu beeinflussen (Mahad und Ransohoff, 2003).

Die Funktion von MCP-1 bei der EAU war in der Vergangenheit ebenfalls Gegenstand von Untersuchungen. Dabei wurde im Verlauf der EAU bei Lewis-Ratten eine intraokulär erhöhte MCP-1 Konzentration festgestellt. Es wird daher angenommen, dass MCP-1 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der EAU spielt (Crane et al., 2001).

Im Unterschied zu vorausgegangenen Tierexperimenten wurden in dieser Arbeit Funktion und Wirkungsmechanismus von MCP-1/CCL-2 bei der EAU mit Hilfe einer modifizierten Variante des MCP-1/CCL-2 untersucht. Durch die Austausch von Arginin an Position 18 und Lysin an Position 19 durch Alanin hat das [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 die GAG-Bindungsfähigkeit verloren, die Interaktion des N-Terminus mit dem Chemokinrezeptor CCR2 wird dadurch aber nicht gestört. [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 kann an CCR2 binden und somit eine CCR2-positive Zelle aktivieren. Bei *in vivo* Versuchen reduzierte [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 im Vergleich zu MCP-1/CCL-2 jedoch die chemotaktische Aktivität von Makrophagen signifikant (Proudfoot et al., 2003), weil [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 – gebunden an CCR2 – die gerichtete Migration der jeweiligen Zelle inhibiert.

D. Diskussion

Eine Blockade der MCP-1/CCL-2 vermittelten Zellrekrutierung durch die Verabreichung von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 sollte demnach auch bei der EAU zu einer Verringerung der Entzündungsaktivität durch reduzierte okuläre Infiltration führen, da [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 an die MCP-1-Rezeptoren der zirkulierenden Zellen bindet und wegen der fehlenden Bindungsaktivität an Glykosaminoglykane die Anheftung an die Endothelien der Gefäße verhindert.

Die EAU kann in Lewis-Ratten entweder durch aktive Immunisierung mit retinalen Antigenen oder durch den adoptiven Transfer pathogener T-Zell-Linien induziert werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf den Verlauf der PDSAg- bzw. R14 induzierten EAU untersucht. Beide Antigene spielen bei der humanen Autoimmunerkrankung eine potentielle Rolle und sind auch im Tiermodell der EAU (Lewis-Ratte) hochpathogen (DeSmet et al., 1990; DeSmet et al., 1993).

Nach Induktion der EAU durch aktive Immunisierung zeichnete sich in den Gruppen mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung bei beiden Antigenen (PDSAg und R14) eine deutliche Tendenz zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes ab. Der entzündungsverstärkende Effekt des [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 fiel in den einzelnen Versuchen allerdings unterschiedlich hoch aus. Entscheidend waren die Applikationsform und der Zeitpunkt der Behandlung.

Nach Immunisierung mit PDSAg bewirkte die tägliche i.p.-Injektion von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 während der Induktionsphase eine signifikante Zunahme der retinalen Destruktionen.

Die orale Applikation von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 blieb hingegen wirkungslos. Einerseits könnte [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 bereits im Intestinaltrakt durch Verdauungsenzyme zerstört werden, andererseits ist fraglich, ob [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 nach oraler Aufnahme durch die Darmschleimhaut in aktiver Form in die Zirkulation gelangen kann oder bereits im GALT an CCR2 bindet. Daher wurde bei den folgenden Versuchen auf die orale Applikation verzichtet (Ausnahme: orale Toleranzinduktion).

Nach Immunisierung mit R14 wurde zusätzlich der Einfluss des Zeitpunktes der [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass eine Behandlung während der Induktionsphase der Erkrankung (ca. Tag 0 - 6), in der die autoreaktiven T-Zellen aktiviert werden, den größten Effekt zeigte. Eine tägliche intraperitoneale Verabreichung während dieses Zeitraumes führte zu einer signifikanten Verstärkung der retinalen Destruktionen, wie histologisch nachgewiesen wurde.

D. Diskussion

Eine spätere Behandlung (Tag 6 – 13: efferente Phase der Immunantwort) mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 bewirkte hingegen nur eine tendenzielle, nicht jedoch eine signifikante Zunahme der Entzündungsintensität.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung in den durchgeführten Versuchen überraschenderweise eine Verstärkung der Immunantwort bewirkte. An der Extravasation und der gerichteten Migration von Entzündungszellen ist MCP-1/CCL-2 maßgeblich beteiligt. MCP-1/CCL-2 könnte darüberhinaus auch die Rekrutierung von regulatorischen Zellen steuern, da regulatorische Zellen CCR2 exprimieren (Brühl et al., 2004). Eine Blockade der MCP-1/CCL-2 vermittelten Migration könnte somit zu einer verminderten Rekrutierung von regulatorischen Zellen und damit letztendlich zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion führen. Diese Hypothese vertreten auch Mack et al., welche an der Kollagen-induzierten Arthritis im Mausmodell forschen. Eine Blockierung von CCR2 mit Antikörpern führte in dem Modell ebenfalls zu einer Exazerbation der Erkrankung (Brühl et al., 2004). In einigen anderen Krankheitsmodellen wie z.B. der nephrotoxischen Serumnephritis (Bird et al., 2000), dem Aspergillus-induzierten Asthma (Blease et al., 2000) und der Acetaminophen-induzierten Hepatitis (Hogaboam et al., 2000) zeigten CCR2 defiziente Mäuse ebenfalls eine stärkere Entzündungsreaktion im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Vermutlich führt auch in diesen Fällen eine Störung der CCR2-Interaktion mit seinem Liganden zu einer verminderten Rekrutierung von regulatorischen Zellen (Brühl et al., 2004). Darüberhinaus wird die Inhibition bestimmter Chemokine aufgrund der großen Redundanz und des komplexen Zusammenspiels der einzelnen Chemokine bei Entzündungsreaktionen (Ferreira et al., 2004) zumindest partiell durch andere Chemokine kompensiert, so dass hier eine Verstärkung der Entzündung durch Inhibition der Gegenregulation über die Hemmung der Entzündungszellen dominiert. Diese Annahme vertreten auch Seifarth et al, nachdem durch Blockade von CCR2 nicht die erhoffte präventive Wirkung auf Diabetes im Mausmodell erzielt werden konnte (Seifarth et al., 2006).

Die Modulation und Suppression von Entzündungsreaktionen durch regulatorische Zellen ist ein nunmehr seit 30 Jahren bekanntes Phänomen, der genaue Phänotyp und Wirkmechanismus dieser Zellen blieb aber lange Zeit unbekannt (Cortisini et al., 2001). Später wurden sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen mit regulatorischer Funktion entdeckt (Cortisini et al., 2001).

CD4⁺ regulatorische T-Zellen exprimieren dauerhaft den IL-2-Rezeptor CD25, während

D. Diskussion

CD4⁺ Effektorzellen CD25 nur kurzzeitig nach Aktivierung auf der Oberfläche tragen (Sakaguchi 2001). Diese regulatorischen CD4⁺ CD25⁺ Zellen (10% der CD4⁺ T-Zellen) werden im Thymus selektioniert und wandern später in die Peripherie aus (Sakaguchi 2001). Die Aktivierung der regulatorischen Zellen erfolgt durch Stimulation mit dem spezifischen Ag (Takahashi et al, 1998; Thornton et al., 1998). Die suppressive Wirkung wird durch direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt und beschränkt sich dann nicht mehr auf das spezifische Ag (Stimulation und Aktivierung ist Ag-spezifisch, Suppression ist Ag-unspezifisch), sondern kann sich über eine sogenannte Bystander-Reaktion entfalten (Grajewski et al., 2006). Da durch die einmal spezifisch stimulierten regulatorischen Zellen theoretisch auch Immunantworten gegen andere pathogene Ag supprimiert werden könnten, ist die gezielte und kontrollierte Wanderung der regulatorischen Zellen zur Aufrechterhaltung eines funktionsfähigen Immunsystems von fundamentaler Bedeutung (Shevach et al., 2001).

Diese Vermutung wurde durch Versuche von Goulvestre et al. bestätigt. Im Mausmodell für die experimentelle Autoimmun-Thyreoiditis konnte nachgewiesen werden, dass MCP-1/CCL-2 *in vitro* regulatorische CD4⁺ CD25⁺ Zellen rekrutieren kann (Goulvestre et al., 2002).

Diese Beobachtung macht wahrscheinlich, dass der CCR2-Antagonist [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 die Migration regulatorischer Zellen inhibiert und ihre verminderte Rekrutierung, wie in den durchgeführten Experimenten beobachtet, letztendlich zu einer Exazerbation der Erkrankung führt.

Bemerkenswert ist, dass bei einer frühen [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung (Aktivierungsphase, Tag 0 - 6 nach R14 Immunisierung) der größte Effekt im Sinne einer Exazerbation zu beobachten war. Dieses Ergebnis beruht vermutlich auf der Tatsache, dass CD4⁺ CD25⁺ Zellen bereits die Induktion einer Immunantwort hemmen können (Shevach, 2001). Daher führte die frühzeitige Inhibition der regulatorischen Zellen durch die [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung in der Induktionsphase auch zu der höchsten Uveitisintensität.

Zusätzlich fällt auf, dass die Zunahme der Uveitisintensität sowohl bei der PDSAg- als auch der R14 immunisierten Gruppe hauptsächlich die Retina betrifft. Während die [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 i.p. behandelten Gruppen in der jeweiligen histologischen Graduierung (betrifft hinteres Augensegment, v.a. Retina) eine signifikante Zunahme der retinalen Destruktionen zeigten, wurde in der klinischen Untersuchung (betrifft vordere Augenkammer, Entzündungsgeschehen im hinteren Augensegment wird nicht erfasst) nur eine tendenzielle Zunahme der Uveitisintensität beobachtet.

D. Diskussion

Die Verabreichung des modifizierten MCP-1/CCL-2 scheint also vor allem das Entzündungsgeschehen in der Retina zu beeinflussen. Bei entzündlichen Prozessen in der Netzhaut nimmt das retinale Pigmentepithel (RPE) eine Schlüsselposition ein, es ist aber auch generell für die Ernährung und Regeneration (Phagozytoseprozesse) der Photorezeptorenschicht wichtig (Forrester, 2003). Dafür ist eine Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen in der Choroidea notwendig, welche durch die konstitutive MCP-1/CCL-2-Sekretion des RPEs gewährleistet wird (Forrester 2003). Bei MCP-1/CCL-2- oder CCR2 defizienten Mäusen kommt es daher ab einem Alter von 9 Monaten zu einer degenerativen Erkrankung der Netzhaut, welche mit der humanen Form der altersbedingten Makuladegeneration vergleichbar ist (Ambati et al., 2003). Unter Umständen bewirkt die Behandlung mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 eine Störung der physiologischen Austauschprozesse (Ernährung der Photorezeptoren und Phagozytoseprozesse) und führt so zu einer erhöhten Anfälligkeit des Gewebes für Entzündungen wie die EAU.

Desweiteren wurde für MCP-1/CCL-2 ein verstärkender Effekt bei Induktion von Immunantworten beschrieben. Tekstra et al. vermuten auf Grund ihrer *in vitro* Experimente, dass MCP-1/CCL-2 die Effektivität der Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen (APC) erhöhen könnte (Tekstra et al., 2001). Inwieweit dazu die Bindung des MCP-1/CCL-2 an Glykosaminoglykane erforderlich ist, wurde noch nicht abschließend geklärt. Unter Umständen ist die GAG-Bindung und somit die Modifikation des [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 in diesem Falle bedeutungslos und das verabreichte [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 führt über diesen Mechanismus additiv zum oben diskutierten Mechanismus zu einer Verstärkung der Immunantwort.

Neben der chemotaktischen Aktivität *in vivo* – für welche die GAG-Bindung eine Voraussetzung darstellt (Proudfoot et al., 2003) – zeigt MCP-1/CCL-2 durch Aktivierung von CCR2 weitere Effekte auf Monozyten.

Neben der Expression von bestimmten Integrinen (Jiang et al., 1992) bewirkt MCP-1/CCL-2 auch die vermehrte Freisetzung von lysosomalen Enzymen (Zachariae et al. 1990) und verschiedenen Cytokinen (Jiang et al., 1992). So beeinflusst MCP-1/CCL-2 zum einen direkt den Aktivierungszustand von Monozyten, zum anderen kann es indirekt durch die IL-1- und IL-6-Sekretion einen aktivierenden Effekt auf B- und T-Lymphozyten haben (Jiang et al., 1992).

Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei MCP-1/CCL-2 nicht nur um ein rein chemotaktisch wirksames Chemokin handelt, sondern dass es darüber hinaus unter bestimmten Umständen

D. Diskussion

eine Verstärkung von Immunantworten bzw. Entzündungsreaktionen bewirken kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings hauptsächlich der Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf die gezielte Migration von Monozyten nach Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke untersucht. In diesem Zusammenhang ist der aktivierende Effekt von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf im Blutstrom befindliche Monozyten - gleichwohl vorhanden - als verhältnismäßig gering einzustufen und damit eher vernachlässigbar.

Um den Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf die efferente Phase der Immunantwort (Rekrutierung von Entzündungszellen) beurteilen zu können, wurde die EAU in einer zweiten Versuchsreihe durch den Transfer Ag-aktiverter spezifischer T-Zellen induziert. Dieses Tierexperiment erlaubt die getrennte Untersuchung der efferenten Phase der Immunantwort, da die *in vitro* stimulierten T-Zellen direkt in das Auge einwandern und dort eine Immunreaktion gegen die jeweiligen retinalen Ag auslösen. Bereits 30 Minuten nach Zelltransfer können die ersten spezifischen T-Zellen im Auge nachgewiesen werden (Thureau et al., 2004).

Bei den einzelnen Versuchen wurden – abhängig von der Ag-Spezifität der verwendeten T-Zelllinie - unterschiedliche Ergebnisse beobachtet. Während die [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung beim Transfer von PDSAg-spezifischen T-Zellen zu einer erhöhten Uveitisintensität führte, bewirkte die [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Verabreichung beim Transfer R14-spezifischer Zellen eine Abschwächung der Immunantwort.

Aufgrund der schnellen Abfolge von Zelltransfer, Zellaktivierung und Beginn der Immunreaktion ist der Einfluss von regulatorischen Zellen in diesem Experiment von geringerer Bedeutung. Die verminderte Rekrutierung CCR2-positiver Zellen müsste demnach in einem mildereren Krankheitsverlauf zum Ausdruck kommen, wie es auch beim Transfer R14-spezifischer Zellen zu beobachten war.

Nach dem Transfer PDSAg-spezifischer Zellen bewirkt die Behandlung mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 hingegen eine Verstärkung der Entzündungsreaktion. In diesem Zusammenhang muss auf die Unterschiede der PDSAg- bzw. R14 spezifischen T-Zell-Linien hingewiesen werden (Diedrichs-Möhring et al., 2005). Bei *in vitro* Versuchen wurde bei R14- im Vergleich zu PDSAg-spezifischen Zellen eine höhere IFN- γ und TNF- α Sekretion festgestellt. Ein weiterer Unterschied besteht in der Interaktion mit unterschiedlichen MHC Klasse II Molekülen. Während PDSAg-spezifische T-Zellen das Peptid zusammen mit RT.1B (entspricht humanem DQ, Maus I-A) erkennen, wird den R14-spezifischen T-Zellen das Peptid durch RT.1D (entspricht humanem DR, Maus IE) präsentiert (Diedrichs-Möhring et al., 2005).

D. Diskussion

In histologischen Schnitten von frühen Stadien R14- und PDSAg-induzierter EAU zeigen sich unterschiedliche Präferenzen in der Lokalisation von Entzündungszellen. Während bei PDSAg-induzierter EAU die Infiltration präferentiell über die Aderhaut und RPE erfolgt, wandern die Leukozyten bei IRBP-induzierter Uveitis überwiegend über die retinalen Gefäße ein.

MCP-1 ist nicht das einzige Chemokin, welches in die Pathogenese der EAU involviert ist. So wurden auch die (inflammatorischen) Chemokine RANTES und MIP-1 α im Verlauf der EAU in erhöhter Konzentration nachgewiesen (Crane et al., 2001). Und auch hier zeigte sich, dass die Wirkung eines entsprechenden CCR1/CCR5 Antagonisten (Met-RANTES) abhängig ist von der Spezifität der Autoimmunantwort (R14/PDSAg) und dem Zeitpunkt der Applikation (Diedrich-Möhrings et al., 2005).

Beim Menschen gestaltet sich die Therapie der Autoimmunuveitis schwierig und beschränkt sich bisher auf die Applikation von immunsuppressiven Medikamenten. Um die Entzündungsschübe kontrollieren zu können, werden Kortikoide, Cyclosporin A und Cytostatika mit teilweise erheblichen systemischen Nebenwirkungen verabreicht. Daher wird intensiv nach neuen Therapiemöglichkeiten gesucht. Einen möglichen Therapieansatz stellt dabei die orale Toleranzinduktion dar.

Als „orale Toleranz“ bezeichnet man das Phänomen, dass das Immunsystem eine systemische Toleranz gegen intestinal aufgenommene lösliche Antigene entwickeln kann (Wells, 1911). Dies ist notwendig, da bei der Nahrungsresorption zum Teil immunogen wirksame Proteine in die Blutzirkulation gelangen (Husby et al., 1985). Durch den Mechanismus der oralen Toleranz werden folglich unnötige Abwehr- und Entzündungsreaktionen gegen harmlose Nahrungsproteine vermieden.

Das Prinzip der oralen Toleranz kann auch als therapeutischer Ansatz für Autoimmunerkrankungen genutzt werden. Durch die orale Verabreichung entsprechender Antigene können pathologische Autoimmunreaktionen supprimiert werden. Dies wurde bereits bei einigen tierexperimentellen Autoimmunerkrankungen wie z.B. der EAE, Adjuvanz-Arthritis, Diabetes und der EAU erfolgreich gezeigt (Higgins et al., 1988; Zhang et al., 1990, 1991; Nussenblatt et al., 1990; Thureau et al., 1991).

Die orale Toleranz ist eine spezifische Leistung des GALT. Zum GALT gehören die intestinale Schleimhaut, die M-Zellen, die Lamina Propria, die Peyerschen Plaques und die mesenterialen Lymphknoten. In Abhängigkeit von der gefütterten Ag-Dosis werden zwei Mechanismen der Suppression unterschieden. Nach oraler Verabreichung einer hohen

D. Diskussion

Dosierung kommt es in der Regel zu einer Anergie oder Deletion der entsprechenden T-Zellen (passive Suppression), während nach Fütterung niedriger Dosierungen vor allem regulatorische T-Zellen heranreifen (aktive Suppression durch antiinflammatorische Cytokine) (Weiner, 1997).

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente wurde der Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf die orale Toleranzinduktion (niedrige Ag-Dosierung) bei der EAU (Lewis-Ratte) untersucht.

Die EAU wurde durch aktive Immunisierung mit dem pathogenen Peptid R14 induziert. Eine Suppression der EAU ist durch die vorherige orale Tolerisierung mit R14 möglich (Diedrichs-Möhring et al., 2005). Wildner et al. konnten 1996 in Transferexperimenten zeigen, dass die immunsuppressive Wirkung der oralen Toleranz in der Ratte durch regulatorische, antigenspezifische γ/δ TCR⁺ Zellen vermittelt wird. Welche Mechanismen die Rekrutierung regulatorischer Zellen steuern ist noch ungeklärt. Vermutlich erfolgt dies durch Ausbildung eines chemotaktischen Gradienten.

Während bereits die ersten Therapieerfolge der humanen Uveitis durch orale Tolerisierung zu verzeichnen sind (Nussenblatt et al., 1990; Thureau et al., 1999), sind die genauen immunologischen Mechanismen der oralen Toleranz noch unbekannt. Um die Therapie noch effizienter gestalten zu können, ist die Aufklärung der genauen immunologischen Mechanismen jedoch von Bedeutung. Von besonderem Interesse ist die Funktion von Cytokinen und Chemokinen. Eine Verstärkung der oralen Toleranz konnte in Tierexperimenten durch die Applikation von IL-2 (Rizzo et al., 1994) bzw. Met-RANTES (CCR1/CCR5 Antagonist) erzielt werden (Diedrichs-Möhring et al., 2005).

Auch das Chemokin MCP-1/CCL2 scheint eine wichtige Funktion im Rahmen der oralen Toleranzinduktion zu haben. Bisherige Untersuchungen ergaben, dass es während der oralen Toleranzinduktion zu einer signifikanten Zunahme der MCP-1/CCL-2-Konzentration in der intestinalen Schleimhaut kommt (EAE-Mausmodell). Dabei scheint MCP-1/CCL-2 in der intestinalen Schleimhaut eine Erhöhung der IL-4- (Th₂) und eine Erniedrigung der IL-12-Konzentration (Th₁) zu bewirken. Durch Verabreichung von Antikörpern gegen MCP-1/CCL-2 wurde die Induktion der oralen Toleranz verhindert (EAE-Mausmodell) (Karpus et al., 1998). Die essentielle Funktion von MCP-1/CCL-2 bei der oralen Toleranzinduktion wurde auch mit Hilfe von MCP-1/CCL2- und CCR2-defizienten Mäusen bestätigt. In knockout-Mäusen konnte im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keine Ag-spezifische Suppression induziert werden (verwendetes Tolerogen: OVA). Untersuchungen der

D. Diskussion

Cytokinkonzentrationen in den Peyerschen Plaques (PP) von knockout-Mäusen zeigten erhöhte Spiegel an IFN- γ und IL-12 bei gleichzeitig erniedrigten Spiegeln an TGF- β und IL 4 (De Paolo et al., 2003).

Bezüglich der Funktion von MCP-1/CCL-2 werden zwei Hypothesen diskutiert. MCP-1/CCL-2 könnte auf der einen Seite für die Bereitstellung und Modulation des Cytokinmilieus verantwortlich sein, welches zur Reifung von regulatorischen T-Zellen notwendig ist (DePaolo et al., 2003). Eine wichtigere Funktion scheint aber auf der anderen Seite die chemotaktische Aktivität von MCP-1/CCL-2 zu sein. Angelockt durch den chemotaktischen Gradienten wandern vermehrt T-Zellen in das GALT ein. Dort werden dann die regulatorischen T-Zellen gebildet, welche anschließend in die Peripherie auswandern (Karpus et al., 1996, 1997, 1998). Auf die EAU übertragen bedeutet dies, dass MCP-1/CCL-2 sowohl an der Rekrutierung von regulatorischen γ/δ TCR⁺ Zellen in das GALT, als auch an deren Migration in das Auge beteiligt sein könnte.

Unter diesen Voraussetzungen müßte die [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung bei der EAU zu einer Störung der oralen Toleranzinduktion führen.

Die orale Tolerisierung mit R14 bewirkte in den durchgeführten Versuchen jeweils eine deutliche, bzw. in der Mehrzahl signifikante Reduktion der Entzündungsintensität. Jedoch wurde weder bei der intraperitonealen noch bei der oralen [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung ein Effekt auf die orale Toleranzinduktion festgestellt werden. Die alleinige Verabreichung von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 zeigte keinen Einfluss auf den Verlauf der EAU.

Im Gegensatz zu den oben zitierten Veröffentlichungen konnte in unseren Versuchen die essentielle Funktion von MCP-1/CCL-2 bei der oralen Toleranzinduktion nicht bestätigt werden.

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist möglicherweise in den Versuchsbedingungen zu suchen. Zum einen handelte es sich bei den publizierten Untersuchungen um einen anderen Tierstamm (Maus versus Ratte) und ein anderes Krankheitsmodell (EAE versus EAU). Zum anderen wurden auch unterschiedliche Ag-Dosierung gewählt. Während Karpus et al. (1998) hohe Dosierungen an Antigen verabreichten, wurden bei den vorliegenden Versuchen niedrige Dosierungen verwendet. Durch niedrig dosierte Ag-Applikation werden eher regulatorische Zellen induziert als nach hochdosierter Ag-Applikation, welche vor allem eine Anergie der spezifischen T-Zellen bewirkt, d.h. MCP-1/CCL-2 könnte im Mausmodell bei der Anergisierung eine Rolle spielen, welche durch γ/δ TCR⁺ regulatorische Zellen vermittelt wird.

D. Diskussion

Die hier gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass MCP-1/CCL-2 keine essentielle Rolle bei der oralen Toleranzinduktion im Rahmen der Ratten-EAU spielt. Diese Hypothese deckt sich mit den Forschungsergebnissen, welche Gonella et al. mit MCP-1/CCL2- und CCR2-defizienten Mäusen im EAE-Modell erzielten. Eine orale Toleranzinduktion mit niedrig dosiertem MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) war auch bei MCP-1/CCL-2 defizienten Mäusen möglich (Gonella et al., 2003).

Die Tatsache, dass [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 in den durchgeführten Experimenten keinen Einfluss auf die orale Toleranzinduktion zeigte, lässt vermuten, dass [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 weder die Rekrutierung noch die Migration von γ/δ TCR+ Zellen inhibiert. Wahrscheinlich sind auch andere Chemokine und deren Rezeptoren für die Migration der γ/δ TCR+ Zellen wichtig, weshalb die Blockade eines einzigen Rezeptors (CCR2) in diesem Fall ohne Wirkung bleibt.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzdoppelfärbung konnten im Verlauf der EAU nach Transfer PDSAg-spezifischer T-Zellen CD8-positive Makrophagen in der Retina nachgewiesen werden. Es wurde früher angenommen, dass das Oberflächenmolekül CD8 nur von T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wird. Mittlerweile wurden jedoch CD8-positive Makrophagen bei vielen verschiedenen Krankheits-Tiermodellen nachgewiesen, wie z.B. bei der EAE (Schroeter et al., 2003), bei der Glomerulonephritis (Tam et al., 1999) und bei der Abstoßung von Nierentransplantaten (Scriba et al., 1998). Die Funktion dieser Zellpopulation ist noch nicht vollständig aufgeklärt, sie zeichnet sich aber anscheinend durch eine starke proinflammatorische Potenz aus. So waren die im Verlauf der EAE nachgewiesenen CD8-positiven Makrophagen zum größten Teil ausschließlich in Regionen mit erheblicher Gewebeschädigung lokalisiert (Schroeter et al., 2003). Diese Beobachtung wird durch *in vitro* Versuche mit Alveolar-Makrophagen gestützt, bei denen die Aktivierung von CD8-Molekülen zu einer Freisetzung von Stickoxid (NO) und IL-1 β führte (Lin et al., 2000).

Welche Rolle die CD8 positiven Makrophagen nun bei der EAU einnehmen, und ob hier Unterschiede in Abhängigkeit von der Ag-Spezifität der übertragenen T-Zelllinie bestehen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen und muß in nachfolgenden Forschungsprojekten untersucht werden.

E. Zusammenfassung

Die humane Form der Autoimmunuveitis ist eine chronisch rezidivierende Erkrankung des Auges und kann über eine fortschreitende Visusverschlechterung bis zur vollständigen Erblindung führen. Eine kausale Therapie ist bisher nicht möglich, weshalb sich die Behandlung der okulären Entzündungsreaktion auf die Applikation entzündungshemmender und immunsuppressiver Wirkstoffe beschränkt. Wegen der erheblichen Nebenwirkungen einer solchen Therapie wird weiter an verbesserten Behandlungskonzepten geforscht. Einen interessanten Therapieansatz stellt die gezielte Blockierung bestimmter Entzündungsmediatoren dar. Zu diesen zählt unter anderem das Chemokin MCP-1/CCL2, welchem wegen seiner chemotaktischen Aktivität (v.a. auf Monozyten) eine bedeutende Funktion in der Pathogenese der experimentellen Autoimmunuveitis (EAU) – einem Tiermodell der humanen Uveitis – zugesprochen wird. Im ersten Teil der Arbeit wurden daher Versuche im EAU-Modell durchgeführt, bei denen die chemotaktische Aktivität des endogenen MCP-1/CCL-2 durch Verabreichung des Rezeptorantagonisten [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 inhibiert wurde.

Die EAU wurde bei den Lewis-Ratten entweder durch aktive Immunisierung mit pathogenen Antigenen oder durch den Transfer Ag-aktivierter spezifischer T-Zellen induziert, um Effekte auf die afferente (Aktivierung) und efferente (Rekrutierung von Entzündungszellen) Phase der Immunantwort zu unterscheiden. Als Antigene wurden die Peptide PDSAg und R14 aus okulären Proteinen verwendet, welche höchstwahrscheinlich auch bei der humanen Uveitis eine Rolle spielen.

Nach EAU-Induktion durch aktive Immunisierung wiesen die mit [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 während der Induktionsphase behandelten Gruppen eine deutlich und häufig signifikant erhöhte Uveitisintensität auf, unabhängig vom Ag, mit dem die Erkrankung induziert wurde. Die Exazerbation der Erkrankung ist wahrscheinlich Ausdruck einer inhibierten Immunmodulation durch regulatorische Zellen.

Die immunhistochemische Auswertung histologischer Präparate zeigte keine [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 abhängige Änderung des Infiltrationsmusters. Es konnten aber erstmals CD8-positive Makrophagen (ED1+ CD8+) bei der EAU nachgewiesen werden. Unter Umständen handelt es sich dabei um eine Makrophagenpopulation, welche vermehrt proinflammatorische Cytokine freisetzt und somit für einen Großteil der Destruktionen verantwortlich zeichnet.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass eine Beeinflussung der EAU durch [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1

E. Zusammenfassung

möglich ist. Der Effekt von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 fällt aber in den einzelnen Versuchsanordnungen, bedingt durch die variable Interaktion mit verschiedenen Zellen (Effektorzellen versus regulatorische Zellen), unterschiedlich aus.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen an einem weiteren potentiellen Therapiekonzept, der sogenannten oralen Toleranzinduktion, durchgeführt.

Dabei wurde in den hier durchgeführten Versuchen der Einfluss von [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 auf die orale Toleranzinduktion mit R14 untersucht. Ein verstärkender Effekt konnte weder bei oraler noch bei intraperitonealer [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1 Behandlung beobachtet werden. In dem verwendeten Tiermodell (EAU bei Lewis-Ratte) scheint MCP-1/CCL-2 folglich keine bedeutende Funktion im Rahmen der oralen Tolerisierung zu spielen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass aufgrund der großen Redundanz und Variabilität, sowie Wirkung der Chemokine auf die unterschiedlichen Zellpopulationen und Zielorgane die therapeutische Nutzung von Chemokin-Antagonisten bzw. Chemokin-Rezeptor-Antagonisten noch problematisch ist.

F. Literaturverzeichnis

Adamus G, Machnicki M, Amundson D, Adlard K, Offner H: Similar pattern of MCP-1 expression in spinal cords and eyes of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis associated anterior uveitis. *J. Neurosci. Res.* (1997) 50: 531-538

Adamus G, Manczak M, Machnicki M: Expression of CC chemokines and their receptors in the eye in autoimmune anterior uveitis associated with EAE.

Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci. (2001) 42: 2894-2903

Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK: An animal model of age-related macular degeneration in senescent CCL2 or CCR2 deficient mice. *Nat. Med.* (2003) 9: 1390-1397

Barton K, Calder VL, Lightman S: Isolation of retinal lymphocytes in experimental autoimmune uveoretinitis: phenotypic and functional characterization.

Immunology (1993) 78: 393-398

Barton K, McLauchlan, Calder V, Lightman S: The kinetics of cytokine mRNA expression in the retina during experimental autoimmune uveoretinitis.

Cell. Immunol. (1995) 164: 133-140

Beneski DA, Donoso LA, Edelberg KE, Magargal LE, Folberg R, Merryman C: Human retinal S-antigen. Isolation, purification and characterization.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1984) 25: 686-690

Bird JE, Giancarli MR, Kurihara T, Kowala MC, Valentine MT, Gitlitz PG, Pandya DG, French MH, Durham SK: Increased severity of glomerulonephritis in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *Kidney Int.* (2000) 57:129

Blease K, Mehrad B, Standiford TJ, Lukacs NW, Gosling J, Boring L, Charo IF, Kunkel SL, Hogaboam CM: Enhanced pulmonary allergic responses to aspergillus in CCR2^{-/-} mice.

J. Immunol. (2000) 165: 2603

F. Literaturverzeichnis

Bloch M, Nussenblatt RB: International uveitis study group recommendations for the evaluation of intraocular inflammatory disease. *Am. J. Ophthalmol.* (1987) 103 (2): 234-235

Borst DE, Redmond TM, Elser JE, Gonda MA, Wiggert B, Chader GJ, Nickerson JM: Interphotoreceptor retinoid-binding protein: Gene characterization, protein repeat structure, and its evolution. *J. Biol. Chem.* (1989) 264: 1115-1123

Brühl H, Cihak J, Schneider MA, Plachy J, Rupp T, Wenzel I, Shakarami M, Milz S, Ellwart JW, Stangassinger M, Schlondorff D, Mack M: Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2⁺ T cells. *J. Immunol.* (2004) 15; 172(2): 890-898

Caspi RR: Immune mechanisms in uveitis. *Springer Sem. Immunopathol.* (1999) 21: 113-124

Caspi RR, Chan CC, Fujino Y, Najafian F, Grover S, Hansen CT, Wildner RL: Recruitment of antigen-nonspecific cells plays a pivotal role in the pathogenesis of a T cell-mediated organ-specific autoimmune disease, experimental autoimmune uveoretinitis. *J. Neuroimmunol.* (1993) 47: 177-188

Caspi RR, Roberge FG, McAllister CG, el Saied M, Kuwabara T, Gery I, Hanna E, Nussenblatt RB: T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *J. Immunol.* (1986) 136: 928-933

Caspi RR, Stiff LR, Morawetz R, Miller-Rivero NE, Chan CC, Wiggert B, Nussenblatt RB, Morse HC, Rizzo LV: Cytokine-dependent modulation of oral tolerance in a murine model of autoimmune uveitis. *Ann. NY Acad. Sci.* (1996) 778: 315-324

Chakravarty L, Rogers L, Quach T, Breckenridge S, Kolattukudy PE: Lysine 58 and histidine 66 at the C-terminal α -helix of monocyte chemoattractant protein-1 are essential for glycosaminoglycan binding. *J. Biol. Chem.* (1998) 273: 29641-29647

F. Literaturverzeichnis

Chan CC, Nussenblatt RB, Wiggert B, Redmond TM, Fujikawa LS, Chader GJ, Gery I: Immunohistochemical analysis of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) in the rat.

Immunol. Invest. (1987) 16: 63-74

Charteris DG, Lightman SL: Interferon-gamma (IFN-gamma) production in vivo in experimental autoimmune uveoretinitis.

Immunology (1992) 75: 463-467

Cortesini R, LeMaoult J, Ciubotariu R, Cortesini NSF: CD8+ CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. Immun. Rev. (2001) 182: 201-206

Crane IJ, Wallace CA, McKillop-Smith S, Forrester JV: Control of chemokine production at the blood-retina barrier. Immunology (2000) 101: 426-433

Crane JC, McKillop-Smith S, Wallace CA, Lamont GR, Forrester JV: Expression of the Chemokines MIP-1 α , MCP-1 and RANTES in experimental autoimmune uveitis.

Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci. (2001) 7: 1547-1552

Curnow SJ, Falciani F, Durrani OM, Gemmy Cheung CM, Ross EJ, Wloka K, Rauz S, Wallace GR, Salmon M, Murray PI: Multiplex bead immunoassay analysis of aqueous humor reveals distinct cytokine profiles in uveitis.

Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci. (2005) 11: 4251 - 4259

De Paolo RW, Rollins BJ, Kuziel W, Karpus WJ: CC chemokine ligand 2 and its receptor regulate mucosal production of IL-12 and TGF- β in high dose oral tolerance.

J. Immunol. (2003) 171: 3560-3567

De Smet MD, Bitar G, Roberge FG, Gery I, Nussenblatt RB: Human S-antigen: presence of multiple immunogenic and immunopathogenic sites in the Lewis rat.

J. Autoimmun. (1993) 14: 249-255

F. Literaturverzeichnis

De Smet MD, Chao Chan C: Regulation of ocular inflammation – what experimental and human studies have taught us. *Pros. Ret. Eye Res.* (2001) 6:761-797

De Smet MD, Yamamoto JH, Mockizuki M, Gery I, Singh VK, Shinohara T, Wiggert B, Chader GJ, Nussenblatt RB: Cellular immune responses of patients with uveitis to retinal antigens and their fragments. *Am. J. Ophthalmol.* (1990) 110:135-142

Diedrichs-Möhring M, Nelson PJ, Proudfoot AEI, Thureau RT, Wildner G: The effect of the CC chemokine receptor antagonist Met-RANTES on experimental autoimmune uveitis and oral tolerance. *J. Neuroimmunol.* (2005) 164: 22-30

Elnor VM, Burnstine MA, Strieter RM, Kunkel SL, Elnor SG: Cell-Associated human retinal pigment epithelium interleukin-8 and monocyte chemotactic protein-1: immunochemical and in-situ hybridization analyses. *Exp. Eye Res.* (1997) 65: 781-789

Faure JP: Autoimmunity and the retina. *Curr. Top. Eye Res.* (1980) 2: 215-310

Ferreira AM, Rollins BJ, Faunce DE, Burns AL, Zhu X, DiPietro LA: The effect of MCP-1 depletion on chemokine and chemokine-related gene expression: evidence for a complex network in acute inflammation. *Cytokine* (2004) 30: 64-71

Fife BT, Huffnagle GB, Kuzeil WA, Karpus WJ: CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* (2000) 192: 899-905

Fong SL, Liou GI, Landers RA, Alvarez RA, Bridges CDB: Purification and characterization of a retinol-binding glycoprotein synthesized and secreted by bovine neural retina. *J. Biol. Chem.* (1984) 259: 6534-6542

Forrester JV: Macrophages eyed in macular degeneration. *Nat. Med.* (2003) 9 (11): 1350-1351

Gery I, Mochizuki M, Nussenblatt RB: Retinal specific antigens and immunopathogenic processes they provoke. *Prog. Ret. Res.* (1986) 5: 75-109

F. Literaturverzeichnis

Gery I, Wiggert B, Redmond TM, Kuwabara T, Crawford MA, Vistica BP, Chader GJ: Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1986) 27: 1296-1300

Gonella PA, Kodali D, Weiner HL: Induction of low dose oral tolerance in monocyte chemoattractant protein-1- and CCR2 deficient mice. *J.Immunol.* (2003) 170: 2316-2322

Goulvestre C, Batteux F, Charreire J: Chemokines modulate experimental autoimmune thyroiditis through attraction of autoreactive or regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* (2002) 32: 3435-3442

Grajewski RS, Silver PB, Agarwal RK, Su SB, Chan CC, Liou GI, Caspi RR: Endogenous IRBP can be dispensable for generation of natural CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells that protect from IRBP-induced retinal autoimmunity. *J. Exp. Med.* (2006) 4: 851 - 856

Gregerson DS, Fling SP, Obritsch WF, Merryman CF, Donoso LA: Identification of T-cell recognition sites in S-antigen: dissociation of proliferative and pathogenic sites. *Cell. Immunol.* (1989) 123: 427-440

Gregerson DS, Merryman CF, Obritsch W, Donoso LA: Identification of a potent new pathogenic site in human retinal S-antigen which induces experimental autoimmune uveoretinitis in Lewis rats. *Cell. Immunol.* (1990) 128: 209-219

Gregerson DS, Obritsch WF, Donoso LA: Oral tolerance in experimental autoimmune uveoretinitis by oral administration of S-antigen and synthetic peptides. *Autoimmunity* (1992) 151: 5751-5761

Higgins PF, Weiner HL: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by oral administration of myelin basic protein and its fragment. *J. Immunol.* (1988) 140: 440

F. Literaturverzeichnis

Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhauser ML, Matsukawa A, Gosling J, Boring L, J-Charo IF, Simpson KJ, Lukacs NW, Kunkel SL: Exaggerated hepatic injury due to acetaminophen challenge in mice lacking C-C chemokine receptor 2.

Am. J. Pathol. (2000) 156: 1245-1252

Hollborn M, Enzmann V, Barth W, Wiedemann P, Kohen L: Changes in the mRNA expression of cytokines and chemokines by stimulated RPE cells *in vitro*.

Curr. Eye Res. (2000) 20: 488-495

Huang BD, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM: Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment of an antigen-specific T-helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Exp. Med. (2001) 193: 713-725

Husby S, Jesenius JC, Svehag SE: Passage of undegraded dietary antigen into the blood of healthy adults. Scand. J. Immunol. (1985) 22: 83-92

Jeffries WA, Green JR, Williams AF: Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. J. Exp. Med. (1985) 162: 117-127

Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT: Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes.

J. Immunol. (1992) 148: 2423-2428

Johnson Z, Proudfoot AE, Handel TM: Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: A new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. Cytokine & Growth Factor Reviews (2005b) 16: 625-636

Johnson Z, Schwarz M, Power CA, Wells TNC, Proudfoot AEI: Multi-faceted strategies to combat disease by interference with the chemokine system.

Trends in Immun. (2005a) 26: 268-274

F. Literaturverzeichnis

Karpus WJ, Kennedy KJ, Kunkel SL, Lukacs NW: Monocyte chemotactic protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T helper cell 1-related cytokines.

J. Exp. Med. (1998) 187: 733-741

Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA: Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. (1997)

J. Immunol. 161: 4129-4139

Karpus WJ, Lukacs NW: The role of chemokines in oral tolerance. Abrogation of nonresponsiveness by treatment with antimonocyte chemotactic protein-1.

Ann. NY Acad. Sci. (1996) 778: 133-144

Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N: Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 28: 12053-12058

Leonard EJ, Yoshimura T: Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1).

Immunol. Today (1990) 11: 97-101

Lin T, Hirji N, Stenton GR, Gilchrist M, Grill BJ, Schreiber AD, Befus AD; Activation of macrophage CD8: pharmacological studies of TNF and IL-1 β production.

J. Immunol (2000) 164: 1783-1792

Mahad DJ, Ransohoff RM: The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Sem. Immunol. (2003) 15: 23-32

Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, et al.: Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. J. Exp. Med. (1988) 167: 1883-97

McAllister CG, Wiggert B, Chader GJ, Kuwabara T, Gery I: Uveitogenic potential of lymphocytes sensitized to interphotoreceptor retinoid-binding protein.

J. Immunol. (1987) 138: 1416-1420

F. Literaturverzeichnis

McLeod DS: T cell traffic and the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1998) 39: 754-762

Mine S, Okada Y, Tanikawa T, Kawahara C, Tabata T, Tanaka Y: Increased expression levels of monocyte CCR2 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2006) 344: 780-785

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA: Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* (2000) 52: 145-176

Nelson PJ, Krensky AM: Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity* (2001) 14: 377-386

Nussenblatt RB, Caspi RR, Mahid R, Chann CC, Roberge F, Lider O, Weiner HL: Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S-antigen. *J. Immunol.* (1990) 144: 1689

Nussenblatt RB, Gery I, Weiner HL, Ferris FL, Shiloach J, Remaley N, Perry C, Caspi RR, Hafler DA, Foster CS, Whitcup SM: Treatment of uveitis by oral administration of retinal antigens: results of a phase I/II randomised masked trial. *Am. J. Ophthalmol.* (1997) 123: 583-592

Palestine AG, McAllister C, Carter C, Keenan AM, Vistica B, Gery I, Davey R, Nussenblatt RB: Lymphocyte migration in the adoptive transfer of EAU. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1986) 27: 611-615

Perry VH, Gordon S: Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. *J. Exp. Med.* (1987) 166: 1138-1143

F. Literaturverzeichnis

Porreca e, Di Febbo C, Reale M, Castellani ML, Baccante G, Barbacane R, Conti P, Cuccurullo F, Poggia : Monocyte chemotactic protein (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells.

J. Vas. Res. (1997): 34: 58-65

Prendergast RA, Iliff CE, Coskuncan NM, Caspi RR, Sartani G, Tarrant TK, Luty GA, McLeod DS: T cell traffic and the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1998) 39: 754-762

Proudfoot AEI, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat R, Wells TNC, Kosco-Vilbois M: Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the *in vivo* activity of certain chemokines. Proc. Natl. Acad. Sci. (2003) 100: 1885-1890

Rizzo LV, Miller-Rivero NE, Chan CC, Wiggert B, Nussenblatt RB, Caspi RR: Interleukin-2 treatment potentiates induction of oral tolerance in a murine model of autoimmunity.

J. Clin. Invest. (1994) 94: 1668-1672

Rollins BJ, Stier P, Ernst T, Wong GG: The human homolog of the JE gene encodes an monocyte secretory protein. Mol. Cell. Biol. (1989) 9: 4687-95

Rollins BJ: JE/MCP-1: an early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine.

Cancer Cells (1991) 3: 517-524

Rollins BJ: Chemokines. Blood (1997) 90: 909-928

Rollins BJ: Monocyte chemoattractant protein-1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. Mol. Med. Tod. (1996) 2: 198-204

Rossi D, Zlotnik A: The biology of chemokines and their receptors.

Ann. Rev. Immunol. (2000) 18: 217-242

F. Literaturverzeichnis

Sakaguchi D, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T: Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity and transplantation. *Immun. Rev.* (2001) 182: 18-32

Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A: The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune response. *Ann. Rev. Immunol.* (2000) 18: 593-620

Schroeter M, Stoll G, Weissert R, Hartung HP, Lassmann H, Jander S: CD8⁺ phagocyte recruitment in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* (2003) 16: 1517-1524

Scriba A, Grau V, Steiniger B: Phenotype of rat monocytes during acute kidney allograft rejection: increased expression of NKR-P1 and reduction of CD43. *Scand. J. Immunol.* (1998) 47: 332-342

Segerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D: Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2000) 11: 152-176

Seifarth C, Mack M, Steinlicht S, Hahn EG, Lohmann T: Transient chemokine receptor blockade does not prevent, but may accelerate type 1 diabetes in prediabetic NOD mice. *Horm. Metab. Res.* (2006) 38: 167 - 171

Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM: Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immun. Rev.* (2001) 182: 58-67

Strobel S: Oral tolerance, systemic immunoregulation, and autoimmunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2002) 958: 47-58

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M: Immunologic selftolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells : induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* (1998) 10: 1969-1980

F. Literaturverzeichnis

Tam FW, Smith J, Morel D, Karkar AM, Thompson EM, Cook HAT, Pusey CD: Development of scarring and renal failure in a rat model of crescentic glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* (1999) 14: 1658-1666

Tekstra J, Tjin EPM, Tuk CW, Broekhuis-Fluitsma, Havenith CEG, Beelen RHJ: Analysis of monocyte chemotactic protein-1 production in different major histocompatibility complex-restricted antigen presentation systems. *Clin. Immunol.* (2001) 101: 77-85

Thornton AM, Shevach EM: CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production.

J. Exp. Med. (1998) 188: 287-296

Thurau SR, Caspi RR, Chan CC, Weiner HL, Nussenblatt RB: Immunologische Suppression der experimentellen Autoimmunuveititis (EAU). *Fortschr. Ophthalmol.* (1991) 88: 404-407

Thurau SR, Diedrichs-Möhring M, Fricke H, Burchardi C, Wildner G: Oral tolerance with an HLA-peptide mimicking retinal autoantigen as a treatment of autoimmune uveitis.

Imm. Let. (1999) 68: 205-212

Thurau SR, Mempel TR, Flügel A, Diedrichs-Möhring M, Krombach R, Kawakami N, Wildner G: The fate of autoreactive, GFP⁺ T cells in rat models of uveitis analyzed by intravital fluorescence microscopy and FACS. *Int. Imm.* (2004) 11: 1537-1582

Thurau SR, Wildner G: An HLA-peptide mimics organ-specific antigen in autoimmune uveitis: its role in pathogenesis and therapeutic induction of oral tolerance.

Autoimmun. Rev. (2003) 2:171-176

Tuaillon N, Chen DF, Berger RB, Lu B, Rollins BJ, Chan CC: MCP-1 expression in endotoxin-induced uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2002) 43: 1493-1498

Verma MJ, Lloyd A, Rager H, Strieter R, Kunkel S, Taub D, Wakefield D: Chemokines in acute anterior uveitis. *Curr. Eye Res.* (1997) 16: 1202 - 1208

F. Literaturverzeichnis

Wells HG: Studies on the chemistry of anaphylaxis (III). Experiments with isolated proteins, especially those of the hen's egg. *J. Infectious Dis.* (1911) 8: 147-171

Weiner LW: Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Rev. Immunol. Today* (1997) 18: 335-343

Wildner G, Hünig T, Thureau SR: Orally induced, peptide-specific γ/δ TCR⁺ cells suppress experimental autoimmune uveitis. *Eur. J. Immunol.* (1996) 26: 2140-2148

Wildner G, Thureau SR: Cross-reactivity between an HLA-B27-derived peptide and a retinal autoantigen peptide: a clue to major histocompatibility complex association with autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.* (1994) 24:2579-2585

Wildner G, Thureau SR: Oral tolerance in autoimmune uveitis. *Dev. Ophthalmol. Basel, Karger* (1999) 31: 67-76

Wildner G, Diedrichs-Moehring M: Autoimmune uveitis induced by molecular mimicry of peptides from rotavirus, bovine casein and retinal S-antigen. *Eur. J. Immunol.* (2003) 33:2577-2587

Wu HY, Weiner HL: Oral tolerance. *Immunol. Res.* (2003) 28/3: 265-284

Yamagami H, Yamagami S, Inoki T, Amano S, Miyata K: The effects of proinflammatory cytokines on cytokine-chemokine gene expression profiles in the human corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2003) 44: 514-520

Yoshimura T, Robinson EA, Appella E, et al.: Three forms of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) distinguished by different lengths of the amino-terminal sequence. *Mol. Immunol.* (1989) 26: 87-93

Zachariae COC, Anderson AO, Thompson HL, Appella E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Matsushima K: Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line. *J. Exp. Med.* (1990): 171: 2177-2182

F. Literaturverzeichnis

Zhang ZY, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL: Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insuline.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 10252-102526

Zhang ZY, Lee CSY, Lider O, Weiner HL: Suppression of adjuvant arthritis in Lewis rats by oral administration of type II collagen. J. Immunol. (1990) 145: 2489-249

Zlotnik A, Yoshie O: Chemokines: a new classification system and their role in immunity.

Immunity (2000) 12: 121-127

G. Anhang

1. Danksagung:

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Kampik, Direktor der Augenklinik und Poliklinik, für die Möglichkeit, die hier vorgelegten Untersuchungen durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. G. Wildner für die Überlassung des Themas, die umfassende Betreuung und die vielen Stunden, die sie für meine Unterstützung aufgebracht hat. Ganz besonders haben mir ihre konkreten Anregungen und ihre konstruktive Kritik bei der Fertigstellung der Arbeit geholfen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. D. Diedrichs-Möhring für ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein Dank gilt ferner Herrn PD Dr. S. Thureau für die hilfreiche Unterstützung, insbesondere bei jeglicher Art von Hard- oder Software-Problemen.

Bei Frau MTA I. Angeli-Rädler möchte ich mich für die Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Präparate und der entsprechenden Färbungen ganz ausdrücklich bedanken.

Herrn PD Dr. P. Nelson möchte ich für seine anregenden Diskussionsbeiträge danken.

Frau Dr. A. Proudfoot (Serono Pharmaceutical, Genf) danke ich für die freundliche Überlassung des modifizierten Chemokins [¹⁸AA¹⁹]-MCP-1.

2. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Andreas Dietrich Helck
Eltern	Georg und Barbara Helck (geb. Ullmann)
Geschwister	Stephan und Thomas
Geburtstag	04.11.1978
Geburtsort	München
Familienstand	ledig

Schulbildung

1984 – 1988	Grundschule
1988 – 1997	Gymnasium
27.06.1997	Abitur
01.03.98 – 31.03.98	Zivildienst (Klinik Dr. Müller, Thalkirchen)

Medizinstudium

01.04.1999	Immatrikulation an der LMU München
27.03.2001	Ärztliche Vorprüfung
21.03.2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2003	Beginn der Dr. Arbeit bei PD Dr. Wildner (Labor für Immunbiologie, Augenklinik der LMU)
April 2004	Abschluß der experimentellen Arbeiten
März 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2005	praktisches Jahr an der medizinischen Klinik Innenstadt
Juni 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung