

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Direktor: Prof. Dr. Dr. F. Holsboer

Proteomanalyse

**humaner Glatiramerazetat und Myelin basisches Protein spezifischer T-Zell
Linien von MS Patienten und gesunden Kontrollpersonen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Matthias Knop

aus

Adelaide

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. F Weber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Hohlfeld

Prof. Dr. H. Kretzschmar

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:**

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2007

Meiner Familie
und
Reinhild Stickling
gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
CD	Cluster of differentiation
COP	Copaxone
cpm	counts per minute
EAE	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FACS	Fluorescens Activated Cell Sorter
GA	Glatiramerazetat
HLA	Human Leucocyte Antigen
IL	Interleukin
IPG	immobilisierte pH-Gradienten
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MBP	Myelin Basic Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSTKG	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
PAF	Platelet activating factor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PHB	Prohibitin
PLP	Proteolipid Protein
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
TH	T Helfer Zelle
TOF	Time of Flight
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	8
1.1	Geschichte der Multiplen Sklerose (MS)	8
1.2	Krankheitsbild und klinischer Verlauf der MS	11
1.3	Neuropathologie der MS	16
1.4	Eigenschaften der autoreaktiven T-Zellen bei MS	18
1.5	Genetik der MS	20
1.6	Therapie der MS	21
1.7	Glatiramerazetat	24
2.	Ziel der Arbeit	28
3.	Material und Methoden	30
3.1	Antigene	30
3.2	Etablierung antigenspezifischer T-Zell Linien	30
3.2.1	Isolation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut	30
3.2.2	Primäransatz	31
3.2.3	1. Restimulation (Split-Well)	31
3.2.4	Weitere Restimulationen	31
3.2.5	Letzte Restimulation vor Lyse/Proteinbestimmung	32
3.3	³ H-Thymidin Proliferationstest	32
3.4	FACS-Analyse	33
3.5	2D SDS-PAGE Gelelektrophorese	34
3.5.1	1. Dimension	34
3.5.2	2. Dimension	35
3.5.3	Fixierung, Färbung und Auswertung der Gele	36

3.6	Massenspektroskopie	37
3.7	Pathway Analyse einzelner Proteine	39
3.8	Probandenauswahl	39
4.	Ergebnisse	41
4.1	Isolierung der T-Zell Linien und Prüfung der Ag-Spezifität	41
4.2	Charakterisierung der T-Zell Linien mittels FACS-Analyse	42
4.3	Identifizierte Proteine	45
4.3.1	T-Zell Linien der Probanden	45
4.3.2	Proteintabellen Probanden	51
4.3.3	T-Zell Linien des MS-Patienten	57
4.3.4	Proteintabellen MS-Patient	59
4.4	Gel-Übersicht	62
4.4.1	Mastergele (Auswahl/Beispiele)	62
4.4.2	Gele einzelner T-Zell Linien	63
5.	Diskussion	64
5.1	Analyse einzelner Proteine	67
5.1.1	Vergleich aktivierte GA-spezifische T-Zellen vor/unter Therapie	67
5.1.1.1	Prohibitin	67
5.1.2	Vergleich aktivierter GA- und MBP-spezifischer T-Zellen	69
5.1.2.1	Transgelin 2	69
5.1.2.2	Gelsolin	70
5.1.2.3	Cyclophilin B	70
5.1.3	Vergleich GA-spezifische T-Zellen vor/unter Therapie und Vergleich ruhender mit aktivierten MBP-spezifischen T-Zellen	71
5.1.3.1	Peroxiredoxine	71
5.2	Beurteilung von 2D-Gelelektrophorese und Massenspektroskopie	73

6.	Zusammenfassung / Summary	74
6.1	Zusammenfassung	74
6.2	Summary	76
7.	Literaturverzeichnis	78
8.	Danksagung	91
9.	Lebenslauf	92
10.	Erklärung an Eides Statt	94

1. Einleitung

1.1 Die Geschichte der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Sie ist, nach der Epilepsie, die häufigste neurologische Erkrankung junger Erwachsener und weist eine große Heterogenität in Bezug auf Klinik, Pathologie und Bildgebung auf. Über Ursachen der Erkrankung oder Faktoren, die zur individuellen Prognose beitragen, ist zur Zeit nur wenig bekannt. Dies obwohl bereits vor über 160 Jahren erstmals die MS in unserer heute bestehenden Definition beschrieben wurde (Pearce et al. 2005).

Die wohl älteste Beschreibung einer zumindest möglichen MS findet sich jedoch schon in der Island-Saga von St. Torlacr. Darin wurde von einer vorübergehenden Blindheit und Sprachstörungen der Wikingerfrau »Hala« in den Jahren 1293 bis 1323 berichtet, die sich unter »Gebet und Opfern« innerhalb weniger Tage wieder zurückgebildet hätten (Medaer 1979). Eine weitere sehr frühe Beschreibung einer möglichen MS im Mittelalter ist in den Aufzeichnungen des Holländers Jan van Beieren zu finden. Er beschreibt die Erkrankung der Nonne Lydwina von Schiedam (1380-1433). Bei ihr kam es, als sie ein 15-jähriges Mädchen war nach einem schlecht heilenden Rippenbruch zu entzündlichen Komplikationen. Im Anschluss setzte eine chronische, sich über 38 Jahre hinziehende Leidensgeschichte mit schubartigen Verschlimmerungen und zwischenzeitlichen Besserungen ein. Unter anderem kam es zur Erblindung des linken Auges, einer Lähmung des rechten Armes, Schmerzen im Bereich einer Gesichtshälfte sowie Krämpfen und Druckgeschwüren in Armen und Beinen. Auch das Tagebuch von Augustus Frederick d'Este (1794-1848), einem Cousin der Königin Victoria von England, liest sich streckenweise wie das Protokoll einer MS (Firth, 1948). Mit 28 Jahren traten erstmals Sehstörungen auf, die sich jedoch völlig zurückbildeten. Es kam dann zu einem schubförmigen Voranschreiten der Erkrankung, die mit etwa 40 Jahren zu einer Rollstuhlabhängigkeit führte.

Die Mediziner des frühen 19. Jh. konnten anfangs das Krankheitsbild nicht einordnen, sondern lediglich beschreiben. Die Befunde der damals durchgeführten Autopsien belegen jedoch eindeutig die von uns heute als MS bezeichnete Befundkonstellation. Der erste bedeutende Schritt zur Erkennung der Pathologie der MS wurde mit der Entdeckung und Beschreibung von Läsionen im Rückenmark durch Jean Cruveilhier (1791-1874) und Robert Carswell (1793-1857) vorgenommen. Im Jahr 1849 tauchte dann erstmals in

einem klinischen Bericht des deutschen Pathologen Friedrich Theodor von Frerichs die Beschreibung von vorübergehenden Besserungsphasen, als eines der charakteristischen Merkmale der MS, auf (Frerichs, 1849). Außerdem erkannte er den Nystagmus als ein Symptom der MS, später ein Teil der bekannten Charcot-Trias, und lieferte die erste medizinische Beschreibung von mentalen Störungen bei MS.

Es war dann der französische Arzt Jean Martin Charcot (1825-1893), wohl der berühmteste und einflussreichste Nervenarzt seiner Zeit, der sowohl die histopathologischen Befunde als auch die klinischen Symptome in ihrer Vielfalt als zu einem Krankheitsbild zugehörig ansah. So untersuchte Charcot im Jahre 1868 eine junge Frau mit einem Tremor, abnormalen Augenbewegungen und auffälliger Sprache. Diese Symptomkombination hatte er noch nie vorher gesehen. Als die Patientin verstarb, untersuchte er ihr Gehirn und fand die von ihm als "plaques" bezeichneten für die MS charakteristischen multiplen Läsionen in der weißen Substanz des Gehirns. Charcot wählte als Krankheitsbezeichnung den beschreibenden Begriff »sclérose en plaques«, da sich die Läsionen in der Autopsieuntersuchung wie verhärtete Narben darstellten. Ab 1872 veröffentlichte Jean Martin Charcot seine berühmten Vorlesungen über Nervenkrankheiten "*Lecons sur les maladies du système nerveus faites à la Salpêtrière* (Charcot, 1877).

Einen ersten Einblick in die Pathophysiologie der damals, in unserer heutigen Konstellation, noch unbekanntem MS lieferte Eduard Rindfleisch, ein deutscher Pathologe des 19. Jahrhunderts, der Gehirne von verstorbenen MS-Patienten analysierte. Im Jahr 1863 berichtete Rindfleisch, dass durchgehend alle Proben ein Blutgefäß in der Mitte einer jeden Läsion aufwiesen (Rindfleisch, 1863).

Die Substanz Myelin wurde erstmals 1854 von dem Pathologen Rudolf Virchow (1821 - 1902) beschrieben. Der aktuelle Begriff des Myelins als lipidreiche Hülle, welche die Axone der meisten Neuronen spiralförmig umgibt und elektrisch isoliert, geht auf die detaillierte Beschreibung des Pariser Pathologen Louis-Antoine Ranvier (1835-1922) aus dem Jahre 1878 zurück. Erst 1962 entdeckte Richard Bunge dann im Elektronenmikroskop, dass das Myelin im ZNS von zellulären Fortsätzen der Oligodendrozyten gebildet wird.

Im weiteren Verlauf des 19. Jahrhunderts wurde die MS rasch als eigene Erkrankung anerkannt und immer mehr Mediziner und Wissenschaftler interessierten sich für die zugrunde liegenden Pathomechanismen. Bereits 1879 schlägt Pierre Marie eine Infektion als Auslöser der Multiplen Sklerose vor. Gleichzeitig wird auch erkannt, dass eine genetische Disposition für MS existiert.

1891 wurde dann die Lumbalpunktion von Quinke eingeführt und erwies sich schnell als bahnbrechender Fortschritt für die Diagnostik der MS.

Im 20. Jahrhundert fand D. Denny-Brown, Professor für Neurologie in Harvard, heraus, dass die Demyelinisierung im Zusammenhang mit Läsionen am Nerv für die blockierte Leitung verantwortlich ist (Denny-Brown, Brenner 1944).

Richtungsweisend für das Verständnis von vielen immunologischen Mechanismen und damit auch für die Pathogenese der MS war zudem die Entwicklung der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis, dem Tiermodell der MS, durch Rivers und Schwentker 1935 (Rivers, Schwentker 1935), die durch eine einmalige Injektion von Hirngewebe kombiniert mit einem Adjuvans, z.B. abgetöteten Tuberkelbazillen, damals in Affen eine EAE induzierten.

Weitere Meilensteine in der MS-Geschichte stellen die mühsam Schritt für Schritt entwickelten und getesteten medikamentösen Therapien dar. Erstmals erfolgreiche Therapieveruche wurden in den 50er Jahren mit Glukokortikoiden unternommen, damals noch in zu geringen Dosen. Erst später erzielten dann Trotter und Garvey (Trotter und Garvey 1980) mit Dosierungen bis zu 3mal 1000mg Prednisolon pro Tag über 5-6 Tage gute Ergebnisse, wobei sich dieses Schema in modifizierter Form bis heute gehalten hat und aktuell die Therapie der 1. Wahl im akuten MS-Schub darstellt.

Ende der 60er Jahre kam dann die immunsuppressive Therapie in der MS auf, nachdem Kenntnisse über die Immunpathogenese aus der Erforschung der EAE bestanden. Azathioprin und Cyclophosphamid waren hier die beiden ersten Substanzen, die - nachdem sie sich als wirkungsvoll in der Unterdrückung sowohl der akuten als auch der chronischen EAE erwiesen hatten (Mertin 1987) - bei MS-Patienten eingesetzt wurden (Silberberg et al. 1973, Frick 1976). Weitere Vertreter wurden im Verlauf als wirksam getestet, u.a. Mitoxantron (Gonsette et al. 1987, Hartung et al. 2002), ein heute neben der Tumorthherapie (Mamma-CA und Leukämie) in der Eskalationstherapie der MS häufig angewendetes Zytostatikum (MSTKG 2000).

Interferone, erstmals von Isaac und Lindemann 1957 als antivirale Substanz beschrieben, gehören zu der körpereigenen Gruppe der Zytokine und besitzen immunmodulatorische und antiproliferative Eigenschaften. In anfänglichen Studien bei MS-Patienten wurde das nur in geringen Mengen verfügbare Interferon, intrathekal verabreicht und zeigte hier neben guter Verträglichkeit auch eine signifikante Reduktion der Schubrate (Jacobs et al., 1981). Seitdem die Interferone mit molekularbiologischen Verfahren in großen Mengen hergestellt werden können, gehört die Therapie mit Interferon-beta zur etablierten

Therapie der schubförmigen remittierenden Verlaufsform der MS. Die Applikation erfolgt s.c. oder i.m..

Eine weitere immunmodulatorische Substanz ist das erstmals 1967 synthetisierte Glatiramerazetat, ein künstlich hergestelltes Polypeptid, das ebenfalls als Therapie der schubförmigen Verlaufsform der MS etabliert ist (siehe hierzu 1.6).

Durch die Entwicklung von bildgebenden Verfahren, wie z.B. der Computertomographie (CT) und der Magnetresonanztomographie (MRT) wurden bedeutende Fortschritte auf vielen Gebieten der medizinischen Forschung ermöglicht. So auch in der Diagnostik der MS und mit einem großen Stellenwert auch in der Beurteilung des Wirkungsgrades von medikamentösen Therapien.

Ian Young veröffentlichte hierzu 1981 eine bedeutende Arbeit, in der die effektive Anwendung und Überlegenheit der MRI gegenüber der CT bei der Diagnose von MS demonstriert wird (Young et al. 1981).

Der nächste bedeutende Schritt im Gebiet der bildgebenden Diagnostik fand 1986 durch Robert Grossman statt, einem Radiologen in Philadelphia. Er entdeckte, dass einige MRT-Läsionen das Kontrastmittel Gadolinium-DPTA anreichern, während andere dies nicht tun (Grossman et al. 1986). Grossman folgerte daraus, dass die Gadolinium-Anreicherung eine pathologische Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke sichtbar macht und so die entzündeten Areale anzeigt.

1.2 Krankheitsbild und klinischer Verlauf der MS

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Sie stellt die häufigste Ursache frühzeitiger Behinderung bei jungen Erwachsenen dar. Betroffen sind Menschen auf der ganzen Welt, die Prävalenz beträgt zwischen 1 und 300 Erkrankungen pro 100 000 Einwohnern, wobei jedoch als sogenannte Hochrisikogebiete z.B. Zentral-, Ost- und Nordeuropa, Nordamerika und Australien gelten. Frauen sind hier 1,5-2mal häufiger betroffen als Männer. Deutschland gehört mit etwa 120-150 Patienten pro 100 000 zu den Ländern mit hoher Prävalenz. (Hein und Hopfenmüller 2000, Poser et al. 1995).

Die Inzidenz wird bei uns auf etwa 2-3 pro 100 000 geschätzt. Das Erkrankungsalter liegt zumeist zwischen dem 20.-40. Lebensjahr (Brandt, Dichgans, Diener 2003).

Die Multiple Sklerose ist eine Erkrankung mit einem komplexen Erscheinungsbild und einem höchst variablen Verlauf. Die Bandbreite der Symptome ist groß und es gibt

grundsätzlich keine für die MS spezifischen klinischen Beschwerden, die nicht auch bei anderen Erkrankungen vorkommen können und anhand derer die Diagnose MS gestellt werden kann. Dennoch gibt es Initialsymptome, die häufiger als andere neurologische Beschwerden zu Beginn der Erkrankung auftreten. Zu diesen meist passageren Frühsymptomen gehören u.a. die meist einseitigen Sehstörungen (Visusminderung) durch eine Sehnerventzündung (Optikusneuritis, Retrobulbärneuritis) oder Augenmuskelparesen, Sensibilitätsstörungen in Form von Parästhesien und dem für die MS typischen Symptom des Lhermitt'schen Zeichens, einer bei Nackenbeugung im Bereich der Wirbelsäule auftretender Mißempfindung. Desweiteren kommt es anfangs häufig zu leichtgradigen spastischen Paresen und einer Extremitäten- und Gangataxie. Im weiteren Verlauf können grundsätzlich alle neurologischen Systeme betroffenen sein. Meist kommt es zu einer Zunahme des Ausprägungsgrades der spastischen Paresen, der Gefühlsstörungen und der Ataxie, aber auch zu urologischen sowie sexuellen Funktionsstörungen (z.B. Blasen- und/oder Mastdarminkontinenz, Entleerungsstörungen sowie erektiler Dysfunktion) und neuropsychologischen Auffälligkeiten. Insbesondere kognitive Symptome mit Aufmerksamkeits-, Konzentrations- und Gedächtnisstörungen, sowie eine reduzierte Belastungsfähigkeit kommen häufig dazu. Nach längeren Krankheitsverläufen kann dann zu der verminderten Leistungsfähigkeit eine verstärkte, abnormale Müdigkeitssymptomatik auftreten (Fatigue-Symptomatik), welche von der, bei MS-Patienten häufiger als in der Normalbevölkerung vorkommenden, depressiven Erkrankung abgegrenzt werden muss.

Ein weiteres MS-typisches und dabei harmloses Symptom ist das sogenannte Uhthoff-Phänomen, welches bei erhöhter Körpertemperatur oder Außentemperatur auftritt und dazu führt, dass Beschwerden wie z. B. Paresen oder Parästhesien vorübergehend zunehmen. Dies ist durch die Verschlechterung der Nervenleitung in den vorgeschädigten Nervenfasern bei höheren Temperaturen bedingt, ohne jedoch Schäden zu hinterlassen. Zu unterscheiden ist dies von einer neuen Schubsymptomatik, bei der es zu einer entzündungsbedingten neuen Schädigung im Bereich der zentralen Nervenbahn kommt. So kann einerseits ein leichter grippaler Infekt durch die Erhöhung der Körpertemperatur zu einer transienten Verschlechterung führen, andererseits wird aber auch angenommen, dass andere entzündliche Prozesse im Körper parallel zur MS, wie eben ein grippaler Infekt oder ein Harnwegsinfekt, Auslöser bzw. Trigger für ein erneutes Schubereignis darstellen.

Verlaufsformen

Hinsichtlich der Verlaufsformen unterscheidet man grundsätzlich den schubförmigen von dem chronisch-progredienten Verlauf. Im klinischen Alltag unterteilt man nochmals genauer in folgende Verlaufstypen der MS und deren Übergangsformen (Abb 1):

Der schubförmig-remittierende Verlaufstyp ist definiert durch klar voneinander abgrenzbare Schübe mit vollständiger Remission oder aber verbleibenden Residuen. Im Intervall zwischen den Schüben darf keine Krankheitsprogression zu verzeichnen sein. Als Schub definiert man akute neurologische Ausfälle bzw. eine Verschlechterung vorbestehender Symptome, die mindestens 24 Stunden lang anhalten, initial meist an Intensität zunehmen, um sich dann vollständig oder teilweise innerhalb von Tagen oder Wochen, manchmal auch erst nach Monaten, zurückzubilden. Kommt es innerhalb von einem Zeitraum von 30 Tagen zu einer weiteren Zunahme/Ausbreitung dieser Beschwerden, werden diese generell dem initialen Schubereignis zugerechnet und nicht einem erneuten Schub (Mc Donald et al. 2001). Die schubförmige Verlaufsform ist mit etwa 70% das häufigste initiale Erscheinungsbild der MS. Bei etwa 50% der Patienten mit initial schubförmig-remittierendem Verlauf kommt es innerhalb eines Zeitraums von etwa 10 Jahren zu einem Übergang in den **sekundär chronisch-progredienten Verlaufstyp** (Weinshenker et al. 1989a). Dieser lässt sich nochmals aufteilen, in eine Form mit aufgelagerten Schüben parallel zu der kontinuierlichen Verschlechterung und in eine Form mit schubfreier chronischer Progression.

Die primär chronisch-progrediente Verlaufsform ist mit etwa 10-15% deutlich seltener (Thompson et al. 1997). Hier kommt es von Beginn an zu einer schleichenden, kontinuierlichen Verschlechterung, meist zu beobachten an der Abnahme der Gehfähigkeit, ohne Schübe. Bei dieser Form der MS stehen häufig spinale Symptome im Vordergrund, die Progression ist im allgemeinen deutlich rascher und damit die Prognose gegenüber der schubförmigen Verlaufsform meist schlechter.

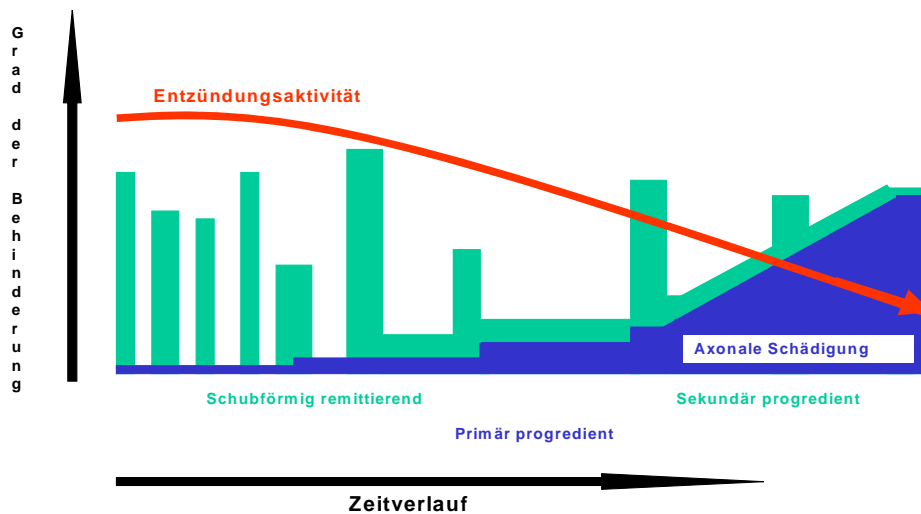


Abbildung 1: Neben den Verlaufstypen, schubförmig-remittierende (grüne Balken), Übergang in die sekundär progrediente (grüne Kurve) und primär progrediente Verlaufsformen (blau) wird die Art der Schädigung im Krankheitsverlauf dargestellt. Anfangs besteht während des überwiegend schubförmigen Verlaufs (Balken) eine hohe Entzündungsaktivität (roter Pfeil), welche jedoch mit Abnahme der Schubanzahl sinkt. Gleichzeitig zur Abnahme der Entzündungsaktivität steigt das Ausmaß der axonalen Schädigung an (blaue Kurve).

Der Unterteilung in die verschiedenen Verlaufsformen kommt neben der klinischen, therapeutischen und prognostischen Bedeutung mittlerweile auch in der Erforschung und dem Verständnis für die, der MS zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen, zunehmende Bedeutung zu.

Klinisch isoliertes Syndrom

Neben der oben beschriebenen Einteilung der Verlaufsformen bei gesicherter MS, gibt es das sogenannte "klinisch isolierte Syndrom (clinical isolated syndrom, CIS)". Die Diagnose eines CIS wird nach der klinischen Erstmanifestation und Ausschluß anderer differentialdiagnostisch in Frage kommender Erkrankungen gestellt. Ob sich im Verlauf das Krankheitsbild einer MS ausbildet und welcher Verlaufstyp dann besteht, ist zum Zeitpunkt der Diagnose eines CIS nicht bekannt.

Diagnosekriterien

Um die Diagnose einer sicheren MS stellen zu können, müssen Diagnosekriterien, welche im Laufe der Zeit wiederholt revidiert wurden, beim individuellen Patienten bestehen. 1965 waren dies die von Schumacher et al. nach den damals neuesten Erkenntnissen aufgestellten, klinisch betonten Kriterien (Schumacher et al. 1965). Es folgten die Poser-Kriterien von 1983, in denen die weiterentwickelten apparativen und laborchemischen Möglichkeiten (hier vor allem die Liquordiagnostik mit dem Nachweis der oligoklonalen Banden) berücksichtigt wurden. Es war damit möglich die Diagnose einer sicheren MS früher zu stellen (Poser et al. 1983).

Aktuell stellen die MS-Diagnosekriterien nach McDonald et al. aus dem Jahre 2001, überarbeitet 2005, die neuste Fassung dar (Polman et al. 2005). Eine besondere Stellung kommt hier der Kernspintomographie (Magnetresonanztomographie, MRT) zu.

Neben den dargestellten Verlaufstypen gibt es weitere Varianten der MS, deren Verläufe gegenüber der „klassischen“ MS oft als hochmaligne einzustufen sind, so z.B. bei der akuten malignen MS vom Typ Marburg, bei der es zu einer Sterblichkeitsrate von bis zu 30% kommt. Eine andere Variante ist das Devic-Syndrom, auch Neuromyelitis optica genannt, charakterisiert durch eine akute ein- oder doppelseitige Optikusneuritis und eine Myelitis. Auch hier ist die Mortalität mit ca. 20% sehr hoch. Einen monophasischen Verlauf weist die akut demyelinisierende Enzephalomyelitis (ADEM) auf, eine vorzugsweise bei jüngeren Erwachsenen auftretende Variante, die durch Impfungen und Infektionen ausgelöst werden kann.

Abgesehen von den erwähnten Varianten der MS mit oft schweren bis letalen Krankheitsverläufen, ist der weitere Verlauf und damit die Prognose der MS individuell nur eingeschränkt vorhersagbar. Hierzu muss zur Abschätzung eine Vielzahl verschiedener Parameter einbezogen werden, u.a. sind dies Verlaufstyp, Schubrate, Rückbildungstendenz der Schubsymptomatik, Anzahl der MRT-Läsionen und vieles mehr.

1.3 Neuropathologie der MS

Die MS ist eine chronisch-entzündliche demyelinisierende, ausschließlich das ZNS betreffende Erkrankung, bei der es zusätzlich zu einer Axondegeneration kommt. Hierbei kommt es zu multifokalen Entmarkungsprozessen, die durch unterschiedlich große, flächige Läsionen, von Charcot „Plaques“ genannt, charakterisiert sind. Die Plaques verteilen sich vorwiegend periventrikulär und perivesikulär über Gehirn und Rückenmark, was als Dissemination bezeichnet wird (Noseworthy et al. 2000). Am deutlichsten zu sehen sind diese Läsionen in der sogenannten „weißen Substanz“ des ZNS, die durch die Axone mit ihrer umgebenen Myelinhülle gebildet wird. Allerdings ist mittlerweile bekannt, dass es auch in der sogenannten „grauen Substanz“, in der die Zellkörper der Neuronen liegen, zu schädigenden Prozessen kommt (Kidd et al. 1999). Im Bereich der Läsionen kommt es u.a. zum Verlust der Myelinscheiden, welche, gebildet von den Oligodendrozyten, die Axone im ZNS umgeben. Neben dem Untergang der Oligodendrozyten und damit dem Verlust der Myelinscheide, kommt es auch bereits zu einem frühen Zeitpunkt zu einer Schädigung des Axons selbst (Trapp et al. 1998). Der Schädigungsmechanismus im Bereich einer Läsion ist entzündlich (siehe 1.4). Je nachdem wie fortgeschritten der Entzündungsprozess und der Grad der Schädigung ist, stellen sich die Läsionen sowohl makroskopisch als auch bildgebend unterschiedlich dar. Man unterscheidet hier aktive von inaktiven Läsionen (Abb. 2).

So kommt es z.B. in alten, inaktiven Herden, in denen der Entzündungsprozess abgeklungen ist, zu einem gliösen Umbau, in dem die untergegangenen Neurone durch gliöses Bindegewebe ersetzt werden. Es bilden sich so im Verlauf viele „verhärtete Narben“ aus, die zum Begriff Multiple Sklerose geführt haben und die konsekutiv zu einer Schrumpfung in der betroffenen Region führen und damit letztendlich zu einer Volumenreduktion, d. h. der Atrophie des Gehirns beitragen. Es gilt jedoch mittlerweile als sicher, dass es in einem Teil der Läsionen nach bzw. bereits während der Zerstörung der Myelinscheiden - der Demyelinisierung - zu einer Remyelinisierung bzw. zu Remyelinisierungsbestrebungen kommt (Brück et al. 2003).

MRT-Schädel Sequenzen
(verschiedene Sequenzen, mit und ohne Kontrastmittel)

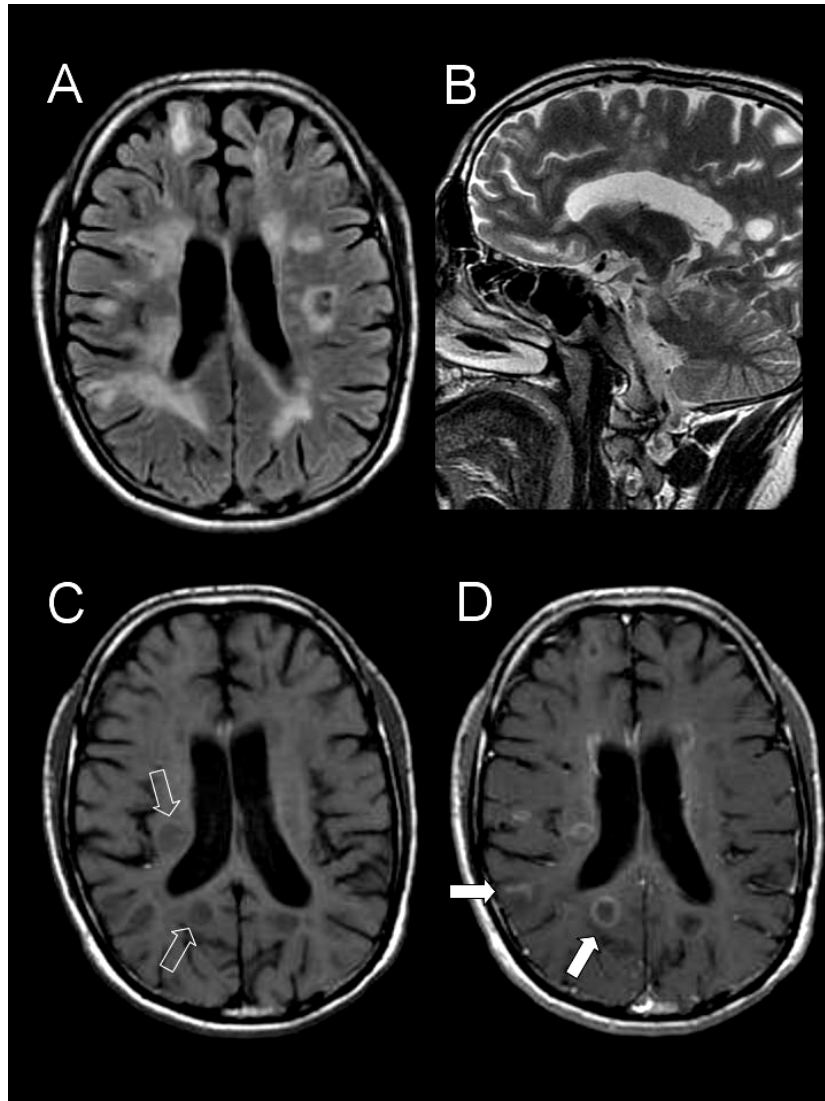


Abbildung 2

zu A: Axiale FLAIR (fluid attenuated inversion recovery)-Sequenz. Fortgeschrittenes MS-Stadium mit multifokalen, teils konfluierenden, vorzugsweise periventriculären (auch juxtaventriculäre) Läsionen; teils auch subkortikale Lokalisation der Läsionen

zu B: T2-Sequenz, sagittale Ansicht. MS-typische Läsionen im Balken (oberhalb des dritten Ventrikels)

zu C: T1-Sequenz ohne KM; Black holes (T1-Hypointensität) als Ausdruck der schweren Demyelinisierung (Pfeile)

zu D: T1-Sequenz mit KM. Solide bzw. ringförmige KM-Aufnahme (Pfeile) als Hinweis auf eine floride Entzündungsreaktion/Blut-Hirn-Schrankenstörung (gleiche Schnittebene wie C)

Histopathologisch findet sich meist im Bereich einer frischen demyelinisierenden Läsion eine perivaskuläre Ansammlung von T-Lymphozyten, Monozyten und Plasmazellen, um eine kleine, zentral gelegene Venole. Im Innern der Läsion ist der Untergang der Oligodendrozyten bereits weit fortgeschritten, der überwiegende Anteil des Myelins zerstört. Am Rand der Läsion besteht eine große Ansammlung von Makrophagen, in denen immunzytochemisch Myelinabbauprodukte nachgewiesen werden können. Diese Konstellation war lange Zeit die einzig bekannte Läsionsform und es wurde angenommen, dass sie bei der Mehrzahl der Patienten vorkommt.

In histopathologischen Untersuchungen an Biopsien und Autopsien wurden kürzlich noch weitere mögliche Subtypen/Stadien von Läsionen gefunden. Diese weichen von der oben beschriebenen Komposition der Entzündungszellen ab. Es kann somit auch histopathologisch von einer beträchtlichen Heterogenität ausgegangen werden. So werden mittlerweile histopathologisch vier sogenannte „Subtypen“ unterschieden. Typ I mit vorherrschend durch Makrophagen vermittelter Demyelinisierung und initial T-Zell vermittelter Entzündung, Typ II mit Antikörper und Komplementfaktoren vermittelter Demyelinisierung zusätzlich zu dem Typ I-Mechanismus mit T-Zellen und Makrophagen, Typ III mit vorherrschend distaler Oligodendrogliepathie mit sekundärer, u.a. ischaemischer Schädigung und Apoptose von Oligodendrozyten und Typ IV mit primärer, metabolisch bedingter Oligodendrozytendegeneration und sekundärer Demyelinisierung v.a. durch Makrophagen (Lucchinetti et al. 2000, Lassmann et al 2001). Von Barnett (Barnett et al. 2004), der nur stundenalte Läsionen untersuchte, wird diese Unterteilung allerdings in Frage gestellt.

1.4 Eigenschaften der autoreaktiven T-Zellen bei MS

Im heutigen Wissen um die Immunpathologie der MS kommt den T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Induktion der perivaskulären Entzündungsreaktionen zu. Die meisten Erkenntnisse über die Funktion der T-Zellen in der als pathogenetisch bedeutsam erachteten Autoimmunreaktion gegen ZNS Proteine wurden initial in der EAE nachgewiesen und konnten bisher teilweise im Menschen, in vitro und in vivo, bestätigt werden. Man nimmt an, dass im peripheren Blut jedes Menschen autoreaktive, also gegen Strukturen des eigenen Organismus gerichtete und damit potentiell pathogene T-Zell-Klone zirkulieren. Bei der MS geht man davon aus, dass diese autoreaktiven T-Zellen

gegen Strukturproteine der Myelinscheiden im ZNS (z.B. Myelin basisches Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), Proteolipid Protein (PLP), Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG)) gerichtet sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese autoreaktiven Myelin-spezifischen T-Zellen auch im Blut von Gesunden vorkommen (Meindl et al. 1993, Lindert et al. 1999). Diese scheinen bei einem intakten Immunsystem jedoch in ihrer Proliferation bzw. Funktion derart supprimiert bzw. inaktiviert zu sein, dass sie keinen Schaden anrichten können. Denkbar wäre, dass bei einer entsprechenden genetischen Prädisposition für MS und hinzukommenden, bislang unbekanntem Umweltfaktoren, spezifische autoreaktive T-Zell-Klone aktiviert werden, wobei man bislang (wie bereits erwähnt) annimmt, dass sich die Spezifität der autoreaktiven T-Zellen in der MS vorwiegend gegen Strukturproteine der Myelinscheiden im ZNS richtet. Es wurde jedoch auch nachgewiesen, dass astrozytäre Proteine wie das kalziumbindende Protein S100 und das GFAP enzephalitogene Eigenschaften besitzen (Kojima et al. 1994, Berger et al. 1997). Dies würde bedeuten, dass das Immunsystem zu irgendeinem Zeitpunkt Kontakt zu diesen weitgehend nur im ZNS vorkommenden Proteinen/Antigenen hatte (Wekerle et al. 1986), und/oder dass zuvor durch eine Infektion oder ein Superantigen, T-Zellen mit Kreuzreaktivität im Sinne eines molekularen Mimikry (Wucherpfennig et al. 1995) gegenüber den Myelinantigenen induziert und/oder reaktiviert wurden. Diese autoreaktiven T-Zellen erlangen dann aufgrund ihres aktivierten Status mit Hilfe verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen die Fähigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das ZNS zu gelangen. Dort initiieren diese T-Zellen (Wekerle 2005) eine Entzündungsreaktion, jedoch erst, nachdem sie mit ihrem spezifischen Autoantigen, das von Mikroglia/Astrozyten über den MHC-Typ-II Komplex präsentiert wird, via ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) in Kontakt gekommen sind und dadurch abermals aktiviert werden. Die nun folgende Entzündungsreaktion läuft lokal, perivaskulär ab und wird maßgeblich durch eine Kaskade proinflammatorischer Zytokine und Chemokine gesteuert. Diese proinflammatorischen Zytokine, u.a. Interferon- γ , TNF- α , Interleukin-2, werden von TH1-Zellen sezerniert, einem Subtyp der T-Lymphozyten, der sich dabei im Zytokinprofil vom eher antiinflammatorischen, immunmodulierenden TH2-Typ, der IL-4, IL-10 und TGF- β produziert, unterscheidet (Del Prete 1998). Als Folge kommt es zu einer Aktivierung weiterer T-Zellen neben CD4+ auch CD8+ zytotoxischen T-Zellen (Babbe et al. 2000, Scotet et al. 1999) aber auch von B-Lymphozyten und weiteren, unspezifischen Immunzellen, welche auch bedingt durch die progrediente lokale Schädigung der BHS und die „Anlockung“ durch Chemokine nun vermehrt in das ZNS eindringen können. Makrophagen-, Antikörper- und Komplement-vermittelt kommt es in der entzündlichen

Läsion zur Demyelinisierung und evtl. auch zu einer axonalen Schädigung. In inaktiven aber auch in aktiven Läsionen parallel zum akuten Entzündungsgeschehen entsteht durch die infiltrierenden Immunzellen nicht nur eine Gewebeerstörung, sondern es könnte auch zu protektiven und reparierenden Abläufen, z.B. durch die Expression/Sekretion von neurotrophen Faktoren wie BDNF (Kerschensteiner et al. 1999) kommen. Auch konnte gezeigt werden, dass T-Zellen Neurturin produzieren (Vargas-Leal et al. 2005), ein Protein, von dem angenommen wird, dass es neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Ob Neurturin auch in MS-Läsionen eine Rolle spielt, wird zur Zeit untersucht.

1.5 Genetik der MS

Aufgrund familiärer Häufung der MS wurden ethnische Gruppen-, Familien- und Zwillingsstudien durchgeführt, in denen starke Hinweise für eine genetische Komponente in der Entstehung der MS aufgezeigt werden konnten. So ist die Häufigkeit der MS in der kaukasischen Rasse am größten, in der afrikanischen Bevölkerung tritt sie dagegen sehr selten auf (Compston 1992). Es scheint, dass es sich bei der MS um eine multifaktoriell und eher polygenetisch bedingte Erkrankung handelt, in der durch die Veränderungen in mehreren Genen, z.B. durch Mutation oder Polymorphismen, eine Prädisposition für die MS bewirkt wird und die dann z.B. durch Umweltfaktoren (u.a. verschiedenste Virusinfektionen, Ernährung) zum Ausbruch gebracht werden kann. So haben Verwandte 1. Grades einer an MS erkrankten Person ein 10-20 mal erhöhtes Erkrankungsrisiko als die Gesamtbevölkerung (Sadovnik et al. 1999), Studien an Zwillingen erbrachten ein 20-40 prozentiges für monozygote und ein 4 prozentiges Erkrankungsrisiko für dizygote Zwillinge, auf die Lebenszeit gesehen (Sadovnick et al. 1993). Als sogenannte Kandidatengene sind hauptsächlich jene Gene interessant, welche an der Immunregulation beteiligt sind und z.B. für Autoimmunprozesse, Zytokine und deren Rezeptoren, MHC-Moleküle oder auch für neurotrophe Faktoren kodieren. Zur Manifestation einer Autoimmunerkrankung, wie sie bei der MS angenommen wird, kommen sehr viele unterschiedliche Gene und Genkombinationen in Betracht, so dass nicht von einer speziell für die MS verantwortlichen Genkonstellation ausgegangen werden kann. Es wird sogar angenommen, dass den unterschiedlichen MS-Phänotypen und evtl. dem unterschiedlich erfolgreichen Ansprechen auf die immunmodulatorischen Therapien, verschiedenartige Pathomechanismen und damit wahrscheinlich auch

unterschiedliche Genprofile zu Grunde liegen. Die bisherigen genetischen Untersuchungen ergaben eine deutliche Assoziation mit dem HLA-Komplex (Human Leukocyte Antigen, Major Histocompatibility complex (MHC)), kodiert in einem Abschnitt auf Chromosom 6p21. Die HLA-Proteine bilden unterschiedliche Klassen des MHC aus, einem Zellmembran-ständigen Komplex, der hauptsächlich für die Antigen-Präsentierung gegenüber Zellen des Immunsystems zuständig ist. Besonders signifikant ist hier die Assoziation mit dem HLA -DR2 Allel, das Teil des MHC-Komplexes der Klasse II ist, welcher sich vorwiegend auf phagozytierenden und professionell antigen-präsentierenden Zellen befindet und der von CD4+ T-Zellen via ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt werden kann.

1.6 Therapie der MS

Prinzipiell unterscheidet man für die Therapie der MS drei Optionen:

- die Therapie des akuten Schubes
- die immunmodulatorische Langzeit/Dauertherapie zur Verhinderung von Schüben oder einer Progression
- die Therapie einzelner Symptome (symptomatische Therapie)

Bei der Auswahl der geeigneten Therapie müssen eine Vielzahl von Faktoren berücksichtigt werden. So spielen das Krankheitsstadium, die Verlaufsform, die Aktivität, der Behinderungsgrad, die im Vordergrund stehende Symptomatik, evtl. Begleiterkrankungen, Alter und Geschlecht (Kinderwunsch) eine Rolle in der Entscheidung ob die Indikation für eine bestimmte Therapie besteht oder wann eine Therapie als wirkungslos bezeichnet werden muss und es damit zu einer Therapieumstellung kommt.

Therapie des akuten Schubes

Die erste und allgemein anerkannte Wahl bei einem akuten Schub ist die seit vielen Jahren etablierte, hochdosierte, intravenöse Gabe von Methylprednisolon (IVMP). Diese Therapie hatte sich durchgesetzt, nachdem die Überlegenheit gegenüber niedrig dosiertem, oral verabreichten Methylprednisolon gezeigt werden konnte (Milligan et al. 1987, Beck 1992) und wird von allen Fachgesellschaften empfohlen. Neben den

antiinflammatorischen und immunsupprimierenden Eigenschaften der Glukokortikoide, kommt es nach Gabe zu einer „Abdichtung“ der Blut-Hirn-Schranke. Vor der Anwendung von Glukokortikoiden müssen zuvor Kontraindikationen, wie z.B. ein akuter Infekt, ausgeschlossen werden.

Dauertherapie

Für die Langzeittherapie der schubförmigen Verlaufstypen der MS gibt es neben den anfänglich ausschließlich aus immunsuppressiven Substanzen bestehenden Therapieoptionen, heute eine Auswahl von verschiedenen immunmodulatorisch wirkenden Medikamenten. Immunmodulatorisch bedeutet, dass diese Substanzen bei der MS wirksam sind, jedoch nicht zu einer Immunsuppression führen. Namentlich sind diese Substanzen das Interferon-beta (IFN-beta), das Copolymer Glatiramerazetat (GA) und die i.v. applizierten Immunglobuline (IVIg).

Ganz aktuell wurde jetzt eine neue Substanzklasse, die der monoklonalen humanisierten Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle (Natalizumab, Tysabri®), zur Behandlung der schubförmigen MS in Europa zugelassen, nachdem zuvor die Zulassung in den USA erfolgt war.

Die Immunsuppressiva Mitoxantron und Cyclophosphamid werden nach wie vor eingesetzt. Allerdings sind sie nur noch bestimmten Indikationen vorbehalten, u.a. in der Eskalationstherapie und als Alternative beim sekundär chronisch-progredienten Verlaufstyp.

Die erste Wahl bei der Therapie der schubförmigen MS und mittlerweile sogar der Frühtherapie sind die immunmodulatorischen Substanzen. Bei rein progredientem Krankheitsverlauf, primär oder sekundär, konnte bislang kein signifikanter positiver Effekt aufgezeigt werden. Es wird vermutet, dass die immunmodulatorischen Substanzen ihre Hauptwirkung in der vorwiegend entzündlichen Phase des Krankheitsverlaufes entfalten, welche durch die Schübe charakterisiert ist.

Interferon-beta ist einer der verwendeten Wirkstoffe. Es wird natürlicherweise im Körper produziert und gehört zur Familie der Zytokine. Diese stellen eine Gruppe von interzellulären Botenstoffe des Immunsystems dar. Das in der Therapie eingesetzte Interferon-beta wird synthetisch einmal als IFN-beta 1a (Avonex® und Rebif®), identisch zum natürlichen humanen IFN-beta, in Säugerzellkulturen hergestellt, und zusätzlich in einer leicht abgewandelten Form, dem IFN-beta 1b (Betaferon®), in gentechnisch

veränderten Bakterienkulturen produziert. Es gibt bisher keine Erkenntnisse über grundsätzliche qualitative Unterschiede der immunmodulatorischen Effekte. Lediglich in der Form (s.c., i.m.) und Häufigkeit (1mal-, 3mal-wöchentlich oder jeden 2. Tag) der Anwendung und in der Konzentration bestehen Unterschiede zwischen den drei Präparaten.

Das Zytokin Interferon-beta besitzt entzündungshemmende und immunmodulatorische Eigenschaften u.a. mit blockierendem Effekt gegenüber den proinflammatorischen Zytokinen Interferon-gamma (IFN-gamma) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) (Giacomini et al. 1988), Reduzierung der Expression verschiedener Entzündungsmediatoren durch Makrophagen (Ling et al. 1985), verbesserte Suppressoraktivität von T-Zellen (Noronha et al. 1993) und Induktion der Synthese von Interleukin-10 (IL-10) und IL-4 (Rudick et al. 1997), d.h. von Zytokinen mit überwiegend antiinflammatorischem Profil.

Für alle drei Präparate konnte eine signifikante Reduktion der Schubfrequenz und der kernspintomographischen Entzündungsaktivität nachgewiesen werden. IFN-beta 1b (Betaferon®) und Interferon-beta 1a in hoher Dosierung (Rebif® 44µg) haben zusätzlich einen nachgewiesenen Effekt bei dem sekundär-progredienten MS-Verlaufstyp, bei dem es noch zu aufgelagerten Schüben kommt.

Intravenöse Immunglobuline sind aktuell als Therapie der 2. Wahl, nach den beta-Interferonen und GA, zur Behandlung der schubförmigen Verlaufsform der MS anzusehen und werden in dieser Anwendung auch von der MSTKG empfohlen. Die Wirksamkeit im schubförmigen Stadium konnte in einigen Studien zwar bewiesen werden, jedoch steht eine für die endgültige Zulassung ausreichend angelegte Studie aus, so dass es in Deutschland/Europa keine Zulassung für die Anwendung von IVIg zur Behandlung der MS gibt. Die IVIg stellen in anderen Autoimmunerkrankungen und bei Allotransplantationen eine etablierte und zugelassene Therapie der 1. Wahl oder eine wichtige Therapiealternative dar. Bei der MS werden sie aufgrund der fehlenden Zulassung und der damit oft nicht gewährleisteten Kostenübernahme durch die Krankenkassen nur in Ausnahmen eingesetzt, so z.B. bei Unverträglichkeit bzw. Kontraindikationen der beta-Interferone und GA. Eine dieser Ausnahmen stellt der Kinderwunsch bzw. die Schwangerschaft und die nachfolgende Stillzeit dar. Die Therapie mit Beta-Interferonen und GA ist während der Schwangerschaft und der Stillzeit kontraindiziert, unbedenklich dagegen ist die Behandlung mit IVIg.

1.7 Glatiramerazetat

Bei Glatiramerazetat (Copaxone®, GA) handelt es sich um eine weitere, etablierte, immunmodulatorisch wirksame Substanz. Als Medikament für die Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose (MS) ist es seit 1996 zugelassen (seit September 2001 auch in Deutschland). Da es in dem experimentellen Ansatz dieser Promotionsarbeit um die Erforschung vermuteter Wirkmechanismen von GA geht, wird dieses Medikament im folgenden Kapitel im Detail vorgestellt.

GA besteht aus dem Azetatsalz eines synthetisch hergestellten Polypeptidgemisches. Die einzelnen Peptide setzen sich aus einer standardisierten Mischung der 4 Aminosäuren L-Glutamin, L-Lysin, L-Alanin und L-Tyrosin zusammen und so entsteht auch der Name des Medikaments „GLATiramer“ aus den ersten Buchstaben der 4 Aminosäuren. GA besitzt ein durchschnittliches Molekulargewicht von 4,7–11,0 kDa. Die Peptide haben eine durchschnittliche Länge von 45–100 Aminosäuren (Farina et al., 2005). Dabei entspricht das im Peptidgemisch vorliegende molare Verhältnis der 4 Aminosäuren Glutamin, Lysin, Alanin und Tyrosin von 1,4 : 3,4 : 4,2 : 1, dem Verhältnis dieser Aminosäuren im basischen Myelinprotein (MBP) (Neuhaus et al., 2001). GA zeigte sich bei oraler Einnahme nicht schubprophylaktisch wirksam (u.a. Filippi et al. 2006) und muss daher weiterhin s.c. in einer Dosierung von 20mg/Tag injiziert werden.

Die Entdeckung von GA geschah eher aus Zufall. In den späten 60er-Jahren untersuchten die Wissenschaftler Michael Sela, Ruth Arnon, Dvora Teitelbaum und Kollegen am Weizmann-Institut in Rehovot, Israel, die immunologischen Eigenschaften von potentiell enzephalitogenen Peptidgemischen, die dem MBP ähnlich waren. Bekannt war, dass die Immunisierung mit MBP als Antigen im Tiermodell die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), die allgemein als Modell der MS im Tier verwendet wird, induzieren kann. Ihr Ziel war es, ein dem MBP ähnliches Peptid als Antigen im Tiermodell zur Induktion der EAE zu finden, um damit herausfinden, ob diese künstlichen Polypeptidgemische ebenfalls über die Fähigkeit von MBP oder von Fragmenten bzw. Regionen des MBP-Moleküls zur EAE-Induktion verfügen (Teitelbaum et al. 1971 und 1972).

Überraschenderweise führte jedoch das Peptid nach Immunisierung nicht zur einer EAE-Induktion, im Gegenteil, es schützte die Tiere vor der EAE und war im Verlauf protektiv wirksam. Auch zeigte sich die suppressive Wirkung von GA auf die EAE nach der Immunisierung mit verschiedenen enzephalitogenen Antigenen und dies auch in

verschiedenen Spezies (Arnon et al. 1996). Obwohl die Wirksamkeit von GA im Tiermodell der EAE verschiedener Spezies, u.a. auch Primaten, gezeigt werden konnte, wurde es dennoch erst Jahre später an einer Gruppe von Patienten mit schwerer schubförmiger MS in Form einer intramuskulären Applikation angewandt, zunächst 2–3mg täglich an 2–3 Tagen über 3 Wochen, später wöchentlich über 2–5 Monate (Abramsky et al. 1977). Damals konnten keine Schlussfolgerungen bezüglich der Wirksamkeit des Medikaments gezogen werden. Die Dosis war zu niedrig. Jedoch traten in diesen Pilotstudien keine signifikanten unerwünschten Nebenwirkungen auf. In den 80er-Jahren wurden dann erstmals klinische Studien durchgeführt, in denen sich neben dem insgesamt guten Sicherheitsprofil auch Hinweise auf die Wirksamkeit von GA bei schubförmiger MS zeigten (Bornstein et al. 1982, 1984, 1991). Vor 1991 war der Herstellungsprozess des Peptidgemisches GA jedoch nicht standardisiert (Johnson et al. 1996, Arnon et al. 1996) und verschiedene Chargen waren nachweislich unterschiedlich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die EAE, so dass die anfänglichen Studienergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden mussten. Dies impliziert auch unterschiedliche Wirkungen von verschiedenen, nichtstandardisierten GA-Chargen bei MS-Patienten in den Pilotstudien. Anfang der 90er-Jahre wurde dann in den USA eine multizentrische doppelblinde, plazebokontrollierte Phase-III-Studie durchgeführt, in der eine hoch standardisierte Zubereitung von 20 mg GA täglich subkutan verabreicht wurde (Johnson et al. 1995). Es zeigte sich, dass GA eine signifikante Reduktion der Schubfrequenz bewirkt und auch einen günstigen Einfluss auf die Krankheitsprogression hat. Daraufhin wurde GA 1996 von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA zur Behandlung von Patienten mit aktiver schubförmiger MS zugelassen (Teitelbaum et al. 1997).

In einer weiteren großen Multizenterstudie konnte zusätzlich auch eine Reduktion der kernspintomographisch messbaren Krankheitsaktivität nachgewiesen werden, ein wichtiges Kriterium für die Zulassung in Europa (Comi et al. 1999, Copaxone MRI Study Group).

Als tägliche Standarddosis werden 20 mg GA subkutan injiziert. Nebenwirkungen treten nur in Einzelfällen lokal und/oder systemisch auf. Dazu gehören Hautreaktionen an der Einstichstelle und das sogenannte Post-Injektions-Syndrom, eine selbstlimitierende, folgenlose vorübergehende möglicherweise systemisch-allergische Überempfindlichkeitsreaktion mit Angstgefühl, Engegefühl in der Brust mit Herzrasen und Luftnot sowie einer Sekunden bis Minuten andauernden Gesichtsrötung.

Man geht davon aus, dass GA durch verschiedene Mechanismen immunmodulatorisch und damit u.a. entzündungshemmend und neuroprotektiv wirkt (Farina et al 2005, Ziemssen et al. 2002). Im Mittelpunkt aller dieser bisher bekannten und angenommenen Mechanismen stehen die GA spezifischen T-Helferzellen (TH-Zellen) mit dem Subtyp TH2, also GA spezifische TH2-Zellen.

Diese müssen jedoch zuerst induziert werden. Dies geschieht im Menschen durch die tägliche Injektion. Das Polypeptid GA führt durch seine multiplen als Antigene wirksamen Peptide bei der erstmaligen Injektion zu einer ausgeprägten polyklonalen in-vitro-Proliferation der Lymphozyten aus dem peripheren Blut (PBL) (Brosnan et al. 1985, Burns et al. 1986). Bei mit GA behandelten Patienten nimmt diese Proliferationsreaktion dann mit zunehmender Behandlungsdauer ab (Brenner et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass diese Abnahme spezifisch für GA ist, weil sie bei sogenannten Recall-Antigenen wie Tetanustoxoid nicht beobachtet wird (Farina et al. 2001).

Das Antigen GA wird nach der Injektion von MHC-Molekülen der Klasse II und auch der Klasse I von Antigen-präsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APC) präsentiert (Ragheb et al. 2000, Dressel et al. 2006). In vitro Studien zeigten, dass es dabei aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit der MHC-Bindung von MBP und anderen Myelin-Antigenen aber auch anderer nicht Myelin-Antigene konkurriert (Fridkis-Hareli et al. 1998, 1999). Dieser myelin-spezifische Effekt spielt wahrscheinlich in vivo im ZNS keine Rolle. Denn nach subkutaner Verabreichung wird GA am Injektionsort so schnell degradiert, dass es nicht das ZNS erreichen kann, wo es mit den relevanten Autoantigenen um eine MHC-Bindung konkurrieren könnte. Somit wird davon ausgegangen, dass GA selbst nur peripher wirkt. Nachdem es als Antigen an den MHC II gebunden ist, wird es via dem T-Zell-Rezeptor (TCR) von GA-spezifischen T-Zellen erkannt, die daraufhin folgenden Auswirkungen der Bindung von GA sind abhängig von der Art der T-Zelle. So geht man davon aus, dass die im peripheren Blut zirkulierenden, möglicherweise pathogenen, autoreaktiven Myelin/MBP-spezifischen T-Zellen, die normalerweise durch ihr spezifisches Antigen zur Proliferation angeregt werden, durch das dem MBP ähnliche, und an den MHC-Bindungsstellen konkurrierende GA-Antigen in ihrer Proliferation gehemmt werden. Nach dieser Hypothese wirkt das GA somit als sogenannter „veränderter Peptidligand“ (altered peptid ligand, APL), ein dem MBP verwandter, in der Molekülstruktur jedoch minimal veränderter Ligand, der auch von MBP-spezifischen T-Zellen erkannt wird, dessen Effekt aber von der ursprünglichen Wirkung abweicht.

Als weiterer Mechanismus ist der von GA bewirkte TH1/TH2 Shift anzunehmen. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass speziell die GA-spezifischen TH2-Zellen

eine protektive Wirkung besitzen - im Gegensatz zu dem eher enzephalitogen wirkenden TH1-Subtyp. So wurden diese TH2 spezifischen T-Zellen von mit GA behandelten Tieren isoliert und unbehandelten Tieren verabreicht, welche damit einen Schutz vor der EAE erlangten (Aharoni et al. 1997). Auf Grund von Untersuchungen im Tiermodell geht man davon aus, dass diese GA-spezifischen TH2-Zellen nach Aktivierung im Rahmen der täglichen s.c. Injektion, durch die BHS (Bluthirnschranke) ins ZNS einwandern und dort mit den Myelinantigenen, präsentiert von lokalen APC (Mikroglia, Astrozyten), kreuzreagieren, damit erneut reaktiviert werden und dann als aktivierte T-Zellen vom TH2-Typ antiinflammatorische Zytokine und neuroprotektive Faktoren sezernieren. Ein wichtiges Zytokin ist hierbei das Interleukin 4, welches lokal eine Inaktivierung/Suppression von autoaggressiven T-Zellen (unabhängig von deren Antigenpezifität) bewirkt, die sogenannte „bystander suppression“. In der EAE konnten die GA-spezifischen TH2-Zellen im ZNS nachgewiesen werden (Arnon et al. 2004), auch Arbeiten an künstlichen Modellen der Blut-Hirn-Schranke bestätigten die Migrationsfähigkeit dieser Zellen (Kim et al. 2004). Es zeigte sich sogar, dass gerade die TH2-Zellen im Vergleich zum TH1-Typ die BHS nach der Applikation von GA vermehrt passieren (Prat et al. 2005). Somit kommt den GA-spezifischen TH2-Zellen eine besondere, entzündungshemmende Rolle in der Immunmodulation der initialen Entzündungsreaktion zu.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Wirkungsmechanismen des GA konnten Neuhaus et al. (Neuhaus et al.2000) in von MS Patienten generierten GA-spezifischen T-Zell Linien, eine GA induzierte Modifikation der T-Zell-Populationen vom TH1-Typ hin zum TH2-Typ nachweisen. Unklar jedoch bleibt, wie GA diesen T-Zell-Shift bewirkt. Ziemssen et al. konnten zeigen, dass humane GA-spezifische TH1 und TH2 Zell Linien das Neurotrophin BDNF (brain derived neurotrophic factor) produzieren (Ziemssen et al. 2002). Das die regelmäßige Gabe von GA zu einer GA-spezifischen Aufregulation der bei unbehandelten MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erniedrigten CD8+ T-Zell Antwort führt, konnte von Karandikar et al. bewiesen werden (Karandikar et al. 2001). In weiterführenden Untersuchungen erfolgte dann von Tennakoon et al. die genauere Charakterisierung dieser GA-spezifischen CD8+ T-Zellen, welche als regulatorischer Subtyp mit suppressiven Eigenschaften identifiziert werden konnten, u.a. mit der Fähigkeit mit Hilfe zytotoxischer Mechanismen CD4+ T-Zellen direkt zu zerstören. GA hebt somit über die Induktion einer zellulär-suppressiv wirksamen CD8+ T-Zell Antwort die bei unbehandelten MS-Patienten reduzierte Immunregulation/-suppression auf das Level von Gesunden an (Tennakoon et al. 2006).

2. ZIEL und FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Experimente im Tiermodell der EAE wiesen bereits früh darauf hin, dass die MS eine hauptsächlich T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankung sein könnte. So wurde beobachtet, dass Myelin-spezifische, CD4+ T-Zellen, die von an EAE erkrankten Tieren generiert wurden, nach dem Transfer in gesunde Tiere eine EAE induzierten, die sogenannte passive oder adoptive EAE, während der Transfer von Antikörpern keine EAE induzierte. Mittlerweile hat sich aufgrund intensiver Forschungsarbeit weltweit das Verständnis des menschlichen Immunsystems und der Autoimmunerkrankungen in wesentlichen Teilen erweitert und damit auch z. T. stark verändert. Viele Studien konnten zeigen, dass neben den T-Zellen, und hier speziell dem CD4+ TH1-Subtyp, noch viele andere Immunzellen und deren Subtypen, u.a. CD8+ T-Zellen, regulatorische T-Zellen (CD4+/CD25+), B-Zellen, Antikörper und Komplementfaktoren für die der MS zugrunde liegenden entzündlichen und degenerativen Pathomechanismen von Bedeutung sind. Als mögliche Autoantigene wurden insbesondere Proteine der Myelinscheide wie z. B. das Myelin basische Protein (MBP) identifiziert. Allerdings wird durch das wachsende Verständnis der immunologischen Abläufe in der MS auch deutlich, dass den CD4+ T-Zellen durchaus eine der Hauptrollen im autoimmunen Teil der Pathogenese zukommen könnte (Weber 2002). So sind die CD4+ T-Zellen direkt und indirekt, u.a. durch ihre Zytokinproduktion, an vielen Abläufen der humoralen und zellulären Immunantwort beteiligt und tragen z.B. dazu bei, dass weitere Immunzellen in das ZNS einwandern können, zytotoxische CD8+ T-Zellen aktiviert werden u.v.m.. Desweiteren wurde in systematischen Genomanalysen zur Identifizierung von Kandidatengenen der MS eine Assoziation zwischen dem Erkrankungsrisiko und dem HLA (Human leukocyte antigen)-Klasse II nachgewiesen, wobei CD4+ T-Zellen ihr Antigen nur in Verbindung mit den HLA-Klasse II Molekülen erkennen können.

Befunde in der EAE und der MS zeigen, dass eine Untergruppe dieser CD4+ T-Helfer-Zellen, die sogenannten TH2-Zellen, eine Schlüsselrolle in den durch das Medikament Glatiramerazetat (GA, Copaxone®) induzierten immunmodulatorisch/entzündungshemmenden Prozessen spielen. Es gibt zwar aus jüngsten Forschungsergebnissen auch Hinweise, dass das artifizielle Polypeptid auch Einfluß auf antigen-präsentierende Zellen wie Monozyten und dendritische Zellen hat (Weber et al. 2004, Hussien 2001), jedoch scheint ein Teil seiner protektiven Eigenschaften speziell durch die Einflussnahme auf die TH2-Zellen bewirkt zu werden. In mehreren Studien konnte mittlerweile gezeigt werden, dass die Behandlung mit GA zu einer Umstellung der anfänglich von TH1-Zellen

dominierten Immunantwort hin zu einem von TH2-Zellen geprägten anti-entzündlichen Immunsystem führt (Neuhaus et al. 2000). Wie GA diesen Wechsel von proinflammatorisch zu antiinflammatorisch bewirkt, ob dies vielleicht durch eine Regulierung auf Proteinebene in den TH-Zellen, hier speziell den CD4+, zustande kommt und welche Proteine hier von Bedeutung sein könnten, ist weiterhin ungeklärt.

Nachdem das menschliche Genom entschlüsselt ist, stellt sich als nächste Herausforderung die Aufdeckung des humanen Proteoms, die Entschlüsselung der durch die Gene codierten Proteine. Dies hat zu neuen Techniken in der Proteinbestimmung geführt mit der Möglichkeit, eine große Anzahl von verschiedenen Proteinen gleichzeitig zu identifizieren. Eine Technik zur Erforschung des Proteoms, die an unserem Institut etabliert ist, besteht aus der 2-dimensionalen Gel-Elektrophorese mit anschließender Massenspektroskopie. Aus unterschiedlichsten Proben, z.B. Zell- oder Gewebelysaten, können die jeweils exprimierten Proteine schnell bestimmt werden und es ist zusätzlich möglich, Aussagen hinsichtlich eines evtl. bestehenden Regulationsunterschiedes zu machen.

Ziel dieser experimentellen Arbeit ist es mit Hilfe der Proteomics-Technik aus den Vergleichen der Proteinprofile MBP- und GA-spezifischer T-Zellen einen Einblick in die Pathogenese der MS und den Wirkungsmechanismen von GA zu gewinnen. Hierzu wurden MBP- und GA-spezifische T-Zellen in verschiedenen Aktivierungsstadien sowie GA-spezifische T-Zellen, generiert vor der Therapie mit GA, mit GA-spezifischen T-Zellen, generiert nach 6 Monaten unter Therapie mit GA, verglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Antigene

Basisches Myelinprotein (MBP), isoliert aus dem Gehirn von Meerschweinchen (Sigma, Germany).

Glatirameracetat, GA (durchschnittliche Molekülmasse 7,000 Da) wurde freundlicherweise von Teva Pharmaceutical Industries, Petah Tiqva, Israel zur Verfügung gestellt.

3.2 Etablierung antigenspezifischer T-Zellen Linien nach der Split-well-Methode

3.2.1. Isolation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)

Die Blutauftrennung zur Gewinnung von PBMCs, und damit die Abtrennung von roten Blutzellen und Granulozyten, erfolgte über einen Ficollgradienten in 50ml Falcon Tubes (ohne Fritte, BD Biosciences, USA). Hierzu wurde auf 15ml Ficoll (Nycomed, Oslo, Norwegen), bei Raumtemperatur (RT), das zuvor 1:1 mit Phoshat Buffer Saline (PBS, Biochrom AG, Berlin, Germany) verdünnte EDTA- (Ethylendiamin-tetraessigsäure) Blut der Probanden (ca 30-40ml) langsam aufgeschichtet. Dann folgte die Zentrifugation bei 800x g (Radius 8,5cm, 2900upm) für 20min bei RT, anschließend wurde das Plasma abgesaugt, der Zellsaum abpipettiert, mit kaltem PBS auf 50ml aufgefüllt, erneut zentrifugiert, diesmal bei 250x g (Radius 8,5 cm, 1650upm) für 10min bei 7°C, der Überstand wieder abgesaugt und das im Tube verbleibende Pellet in PBS resuspendiert und bis auf 50ml aufgefüllt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der Neubauer Zählkammer. Hierzu wurde eine aus 90µl Methylblau/PBS + 10µl Zellsuspension bestehenden Suspension im Eppendorf-Cup hergestellt und auf die Zählkammer aufgetragen. Es wurden alle 4 Quadranten ausgezählt und wie folgt berechnet: $\text{Zellzahl} / 4 \times 10000$ (Tiefe d. Zählkammer) $\times 50\text{ml}$ (Volumen d. Zellsuspension) $\times 10$ (Verdünnungsfaktor) = Gesamtzellzahl. Vor der Aufteilung in die einzelnen Wells wurde erneut zentrifugiert, bei 250x g (Radius 8,5cm, 1650upm) für 10min bei 7°C.

3.2.2 Primäransatz

Das Pellet wurde dann mit T-Zell Kulturmedium ((RPMI 1640 Medium, Biochrom AG, Deutschland), 2mM L-Glutamin (Gibco), 100U/ml Penicillin (Gibco), 100 µg/ml Streptomycin und 5% hitzeinaktiviertes, humanes AB-Serum (AB-Serum, Sigma)) auf 2 Mio. Zellen/ml eingestellt. Je Well (96 Well Rundbodenplatte, Nunc, Wiesbaden, Germany) wurden 100µl der Zellsuspension ausgesät und 10µl des Antigens MBP (300µg/ml) oder GA (200µg/ml). Es folgte die Inkubation im Brutschrank für 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂. Nach den 3 Tagen erhielt jedes Well 100µl RPMI mit 30U/ml rekombinantem Interleukin-2 (IL-2, Strathmann Biotec, Hamburg, Germany). Dies wurde dann alle 3 Tage wiederholt, dabei wurden jeweils 100µl Überstand abgesaugt und mit jeweils 100µl RPMI-Medium + 30U/ml IL-2 wieder aufgefüllt, bis dann nach 3 Wochen die 1. Restimulation nach der Split Well Methode folgte (Pette et al. 1990).

3.2.3 Erste Restimulation (Split-Well)

Hierzu wurden erneut PBMC's vom gleichen Spender wie oben beschrieben gewonnen, das Pellet mit 50Gy bestrahlt und auf 4 Mio Zellen/ml mit RPMI-Medium eingestellt. Der Überstand wurde aus der 96-Well Platte komplett abgesaugt und das im Well verbleibende Pellet mit 100µl RPMI-Medium (RT, ohne IL-2) resuspendiert. 50µl wurden dann hiervon entnommen und in das benachbarte, leere Well pipettiert. Eines der zwei Wells wurde wieder mit dem jeweiligen Antigen versorgt (Dosierung siehe oben). In alle Wells kamen dann 50µl bestrahlte PBMC's. Es folgte die Inkubation für 3 Tage bei 37°C und im Anschluß mikroskopisch die Überprüfung der Spezifität. Hierzu wurden jeweils die Wells einer Linie, eines mit, eines ohne Ag, verglichen. Zellcluster im Well mit Ag, bei fehlenden Zellclustern im Well ohne Ag, wurden als Hinweis auf eine positive Antigen-spezifität gewertet. Die unspezifischen und die antigenfreien Wells wurden verworfen. Alle 3 Tage bis zur nächsten Restimulation, jetzt jeweils nach 14 Tagen, wurden die Zell-Linien mit jeweils 100µl RPMI + 50 U/ml IL-2 versorgt.

3.2.4 Weitere Restimulationen

Die PBMC's wurden wie oben beschrieben gewonnen, die resuspendierten Pellets mit 50Gy bestrahlt, auf 4 Mio. Zellen/ml eingestellt und je nach Zellmenge auf 24 oder 96-Well Platten verteilt.

Bestückung der 96 Well-Platten: wie oben beschrieben.

Bestückung der 24 Well-Platten :

Die Zellsuspension einer Linie wurden in einem Tube aus den einzelnen Wells gesammelt und bei 250x g (Radius 8,5cm, 1650upm) für 10min bei 7°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in RPMI-Medium resuspendiert, Einstellung auf 2 Mio. Zellen/500µl. 500µl der Zellsuspension kamen dann in ein Well, zusätzlich die 500µl bestrahlten PBMC's. Anschließend wurde noch das jeweilige Antigen hinzugefügt, 100µl/well.

Auch die 24-Well-Platen wurden bei 37°C inkubiert und alle 3 Tage mit 1000µl RPMI 50 U/ml IL-2 versorgt bis zur folgenden Restimulation.

Zur Spezifitätstestung mittels ³H-Thymidin wurden ab der 2. Restimulation bei jeder weiteren Restimulation zusätzlich für jede Zell-Linie 4 Wells in 96 Well Platten mit jeweils 50µl T-Zell-Suspension + 50µl PBMC's angelegt. Nur 2 dieser 4 Wells wurden mit 10µl Antigen (MBP oder GA) versorgt und hier die Spezifität bestimmt (siehe 3.3).

3.2.5 Letzte Restimulation vor Lyse/Proteinbestimmung

PBMC's wurden wie oben beschrieben gewonnen. Die Zellsuspension der einzelnen Wells einer Linie wurden gesammelt und anschließend die Zellen gezählt. Zentrifugiert wurde bei 250x g (Radius 8,5cm, 1650upm) für 10min bei 7°C, dann das Pellet mit IL-2 freien Medium auf 2 Mio. Zellen/ml eingestellt und wie oben beschrieben in die Wells einer 24 Well Platte pipettiert, jedoch in der Aufteilung 15 Wells ohne Antigen und 10 Wells mit Antigen. Zusätzlich wurde für jede Linie ein Spezifitätstest angelegt (siehe 3.2.4 und 3.3). 3 Tage bei 37°C inkubiert, die Wells dann mit 1000µl RPMI 50 U/ml IL-2 versorgt und nach 2 Tagen die T-Zell Linien getrennt nach +/- Antigen in 50ml Tubes aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt und erneut bei 250x g (Radius 8,5cm, 1650upm) für 10min bei 7°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das übrig gebliebene Pellet wurde in einem Eppendorf-Cup auf 10 Mio Zellen/ml eingestellt, erneut zentrifugiert und bis zur Proteinkonzentrationsbestimmung bei -80 °C weggefroren.

3.3 ³H-Thymidin Antigenspezifitäts-/Proliferationstest

Die antigenspezifische Proliferation der T-Zell Linien wurde mittels ³H-Thymidin-Einbau bestimmt. Hierzu wurden zusätzlich ab der 2. Restimulation und jeder folgenden Restimulation für jede T-Zell Linie 4 Wells a 50µl T-Zellen + 50µl PBMC's in 96 Well

Platten angelegt. Nur 2 dieser 4 Wells erhielten dann zusätzlich 10µl Antigen (MBP oder GA). Nach 3 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden pro Well 10µl a 0,22 µCi ³H-Thymidin (2 Ci/mmol spezifische Aktivität, Amersham, Braunschweig, Deutschland)) hinzugegeben und nochmals für 18 h inkubiert und anschließend geerntet oder bei -20°C weggefroren.

Die Zellen wurden anschließend mit einem automatischen Cell-Harvester (PHD™ cell harvester, Cambridge Technology Inc., Model 200A) aus den Wells „geerntet“ und auf jeweils ein Filterpapier aufgetragen. Dieses Filterpapier wurde dann in eine Szintillationssuspension (Lumasafe™ Advanced safety LSC cocktail, Lumac-LSC, Netherlands) eingelegt. Als abschließender Schritt erfolgte die Bestimmung der von dem beta-Strahler ³H abgegebenen Strahlung mit Hilfe eines Flüssigszintillatorzählers (Liquid Scintillation Counter (LSC), Beckman-Coulter, Model LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter). Dieser zählt die Strahlungsintensität in Counts per minute (cpm).

Bei stark proliferierenden Zellen, wie es bei spezifischen Zellen nach der Gabe des passenden Antigens zu erwarten ist, wird vermehrt das radioaktiv markierte Thymidin, eine der vier organischen Basen der DNA, in die DNA eingebaut. Der Mittelwert der cpm der 2 Wells mit Antigen wird durch den Mittelwert der cpm der 2 Wells ohne Antigen dividiert. Wenn der Quotient >2 ist, wird die T-Zell Linie als antigenspezifisch angesehen.

3.4 FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting = fluoreszenzaktivierte Zellanalyse/Durchflusszytometrie)

1 Mio. Zellen wurden pro Zelllinie abgetrennt, aufgeteilt in 2 Eppendorf-Cups für die Isotyp-Kontrollantikörper und die spezifischen Antikörper, jeweils mit 1ml Waschpuffer (PBS, 2 % hitzeinaktiviertes Foetal Calf Serum (FCS)) gewaschen und die Pellets dann in 100 µl PBS/FCS resuspendiert. In ein Tube wurden 20µl anti-CD3 PE-markierte monoklonale Antikörper (mAK), 20µl anti-CD4, FITC-markierte mAK und 10µl anti-CD8 ,PC5-markierte mAK gegeben und für 30min bei 4 °C im Dunklen inkubiert (CD4, CD3 und CD8 mAK und Isotyp-Kontrollen, Beckmann-Coulter, Krefeld, Germany). In das andere Tube wurden 20µl des Isotypes der spezifischen Antikörper, die ebenfalls PE, FITC und PC5 markiert waren, hinzugefügt und wie oben beschrieben inkubiert. Die Suspensionen wurden dann zentrifugiert (500x g, 3300upm, Radius 8,5cm, (Biofuge fresco, Heraeus, Germany) für 5min. bei 4°C), die Überstände abgesaugt, 2-mal in PBS/FCS gewaschen und die Pellets zum Schluss in 1ml PBS resuspendiert, umgefüllt in

FACS-Röhrchen (Sigma). Die Analyse erfolgte in dem Durchflusszytometer von Beckman-Coulter (Model EPICS XL, 4Color).

Die in Lösung befindlichen Zellen werden hierbei durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl. Bei Auftreffen des Laserlichts auf die Zelle, emittiert diese Streulicht, welches durch die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran aber auch intrazelluläre Bestandteile beeinflusst wird. Das nach vorne gestreute Licht (Vorwärtsstreulicht, FSC (*Forward Scatter*)) wird dabei durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße, das zur Seite abgestreute Licht (Seitwärtsstreulicht, SSC (*Side Scatter*)) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns etc.). Wurden die zu bestimmenden Zellen zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörpern inkubiert, kann hiermit auch eine Sortierung nach anderen Zellmerkmalen erfolgen. In unserem Fall ist dies die Identifizierung der T-Zellen über das CD3 Antigen und die Unterteilung in den CD4+ oder CD8+ Phänotyp.

3.5 2D Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

3.5.1 Erste Dimension: Lyse, Rehydratation und isoelektrische Fokussierung auf IPG-Gelstreifen (immobilisierte pH-Gradienten)

Die Proteine wurden mit 300µl/Pellet Lysepuffer (2% NP-40, 200mM 1,4-Dithiothreit (DTT, Roth, Karlsruhe, Germany), 4% 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane Sulfonat (CHAPS, Genaxxon bioscience, Biberach, Germany), 5 mM MgCl₂, 0,5µl RNAse (Qiagen), 40mM Tris pH 8.3) in Lösung gebracht, 150U DNase (Qiagen) und 2µl 100mM Phenylmethylsufonylfluorid (PMSF, Sigma) dazugegeben und auf einem Vortex™ gut gemischt. Anschließend wurde die Lösung für 45min bei RT inkubiert und dann mit 300µl/Pellet Rehydrationspuffer (=IEF-Puffer, 2M Thiourea (Merck), 7M Urea (Merck), 2% CHAPS, 0,2% Biolyte pH 3-10 (Bio-Rad, München, Germany), 100mM DTT (Roth), 0.001% Bromophenol blue (Sigma)), PMSF, Pepstatin (Roche, Mannheim, Germany) und einem Protease-Inhibitions-gemisch (Complete protease inhibitor cocktail, Roche) gemischt bevor eine weitere Inkubation von 30min auf Eis folgte. Im Anschluß wurde die Mischung bei höchster Geschwindigkeit (16 060x g (13 000upm, Radius 8,5cm)) für 20min zentrifugiert und 300µl des klaren Überstandes auf einen 17cm IPG-Streifen mit der pH-Breite 3-10 (non linear ReadyStrip IPG strips, Bio-Rad) für die isoelektrische Fokussierung (IEF, 1. Dimension) in die Fokussierungskammer (Model PROTEAN IEF

Cell, Bio-Rad) gegeben. Zusätzlich wurden die IPG-Streifen mit 2-3ml Mineral-Oil (biotechnology grade, Bio-Rad) abgedeckt, um während der nun folgenden aktiven Rehydratation das Verdunsten der Proteinsuspension zu verhindern. Die Rehydratationsphase, welche dazu dient die Proteine in den IPG-Streifen aufzunehmen, dauert ca. 12 Stunden (bei 50 Volt, 20°C). Danach wurden unter die Streifenenden jeweils im Bereich des Auflagepunktes auf den Elektroden angefeuchtete Papierstücke gelegt und die automatisierte, isoelektrische Fokussierung (Elektrophorese) nach dem Protokoll von Bio-Rad in der PROTEAN IEF Kammer gestartet (Beginn 500 Volt, max. 10 000 Volt, 40-60 000 Vhours, 20°C). Die Auftrennung der Proteine erfolgt hier auf der Basis ihres relativen Gehalts saurer und basischer Aminosäurereste entlang eines pH-Gradienten. An einem für jedes Protein genau definierten pH-Wert heben sich die Ladungen der basischen und sauren Aminosäuren in einem Proteinmolekül auf, sodass sich das Molekül nach aussen ladungsneutral verhält, dies entspricht dem sogenannten isoelektrischen Punkt. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung kommt es zu einer Separation der Proteine nach dem jeweiligen isoelektrischen Punkt.

3.5.2. Zweite Dimension: Equilibrierung und SDS-PAGE

Bei dem nun folgenden Schritt der Equilibrierung wurden die Proteine im Gel auf dem IPG-Streifen mit dem 1. Equilibrierungspuffer (50mM TrisHCL, 6M Urea, 2% Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate (SDS), SERVA, Heidelberg, Germany), 20% Glycerol, dest. H₂O, 1g DTT) zur Beseitigung von Disulfidbrücken für 10min bei RT inkubiert, dann nochmals für 10min im 2. Equilibrierungspuffer (50mM TrisHCL, 6M Urea, 2% SDS, 20% Glycerol, dest. H₂O, 1,25g Iodacetamid) mit SDS 2% beladen. SDS ist ein negativ geladenes Detergenz und führt dazu, dass sich die einzelnen Proteinmoleküle komplett auffalten können. Bei der sogenannten Linearisierung binden eine Vielzahl von negativ geladenen SDS-Molekülen an jedes einzelne Proteinmolekül (an die hydrophoben Regionen), so dass die Eigenladung des jeweiligen Proteinmoleküls überdeckt/maskiert wird. Alle Proteinmoleküle besitzen damit nach aussen die gleiche (negative) Ladung.

Dies ist Voraussetzung zur erfolgreichen Durchführung der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese bzw. 2. Dimension. Hierzu wurde pro IPG-Gelstreifen ein Flach-Gel (12% Polyacrylamid IEF-Gel, 0,5-1,5 mm dick) gegossen. Die Herstellung der Gele erfolgte durch Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS, >98%, Roth) als Radikalstarter zu einem Acrylamid-biphosphat-Gemisch (SERVA), es wird damit die Polymerisation von Acrylamid zu Polyacrylamid gestartet, als Katalysator dieser Kettenreaktion diente

Tetramethylethyldiamin (TEMED, Roth). Die anfänglich noch flüssige Masse wurde in die Gelkammern, jeweils zwei abgedichtete, durch einen Abstandhalter von einander getrennte Glasplatten, geleitet und polymerisierte dort zu den Trenngelen aus. Die IPG-Gelstreifen wurden nach dem Aushärten der Gele in einen dünnen Extrastreifen, dem sogenannten Sammelgel (Acryl-bisphosphat, SDS 10%, TEMED, APS 10%, dest. H₂O, TrisHCL 0,5M), an der Oberkante der Gele eingefügt. Zusätzlich zu den Proben wurde in eine Tasche am Rand der Gele der negativ geladene Farbstoff Bromphenolblau (Sigma) zugesetzt. Die Gele wurden dann in die Elektrophoresekammer der 2. Dimension, gefüllt mit einem TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-Glycin-SDS-Puffer (Bio-Rad), senkrecht eingefügt. Dieses System wurde ursprünglich von U.K. Laemmli entwickelt (Laemmli et al. 1970). Es wurde dann die Spannung von 50 Volt in der ersten Stunde, anschließend 200 Volt bis zum Ende des Gellaufes in der Kammer angelegt.

In der 2. Dimension (2. Elektrophoresephase) wird die Gesamtheit der durch die Equilibrierung mit überschüssiger negativer Ladung versehenen Proteine senkrecht zur ersten Dimension durch Anlegen des elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wandern kleine Moleküle zügiger durch das „Polyacrylamidnetz“ als Moleküle mit einer hohen Masse. Kurz bevor die ersten Moleküle auf ihrer „Wanderung“ zur Anode auf der gegenüberliegenden Seite vom IPG-Streifen, das Gel komplett durchwandert haben, wird der Lauf gestoppt.

3.5.3. Fixierung, Färbung und Auswertung der Gele

Nach erfolgter elektrophoretischer Trennung müssen die Proteine auf dem Gel fixiert werden. Dazu wurden die Gele, nachdem sie aus den Glasplatten am Stück herausgelöst wurden, für 12 Stunden in eine Fixierungslösung (90% Ethanol, 6% Phosphorsäure, dest. H₂O) eingelegt. Danach erfolgte das 3-malige Waschen in dest. H₂O und die Vorbereitung der Färbung in der Färbelösung (17% Ammoniumsulfat, 2% Phosphorsäure, 34% Methanol, dest. H₂O) für 1 Stunde.

Die Anfärbung der Proteine erfolgt dann mit jeweils 250mg/Gel Coomassie brilliant blue (Sigma) über 3-4 Tage auf einer sich bewegenden Plattform. Hierbei lagert sich das Coomassie Blue an basische Seitenketten der Proteine an.

Die Gele wurden mit einem Scanner (UMAX Systems GmbH, Willich, Germany, GS-800 Calibrated Densitometer, Model PowerLook 2100XL) digitalisiert und mit dem Auswertungsprogramm PDQuest™ (Version 7.2.0, Bio Rad, USA) weiterverarbeitet. In einem ersten Schritt wird hierbei das digitalisierte Bild des Gels von sogenannten

Hintergrundartefakten sowie stärker ausgeprägten horizontalen und vertikalen Streifenbildungen „gesäubert“. Als nächster, automatisierter Schritt folgt, nachdem man manuell verschiedene Densitäts-Grade von Protein-Spots festgelegt hat, eine vorläufige Protein-Spot Detektion/Markierung. Es muß nun nachfolgend eine zusätzlich manuelle, individuelle Protein-Spot Identifizierung jedes einzelnen Gels durchgeführt werden, da die automatisierte Spot-Analyse einige der Protein-Spots gar nicht bzw. falsch markiert (z.B. in Regionen in denen sich mehrere Spots überlagern). Auch werden oft als Artefakte auszumachende Strukturen fälschlicherweise markiert und müssen dann manuell gelöscht werden. Nachdem alle in Frage kommenden Spots markiert wurden, müssen die einzelnen Spots nun mit ihrem jeweiligen vorhandenen bzw. evtl. nicht vorhandenen korrespondierenden Protein-Spot eines jeden Gels eines Vergleiches „gematcht“ werden. Dies erfolgt, indem man eines der Gele zum Master- (Referenz-) Gel bestimmt, d.h. alle Protein-Spots, die auf den Gelen des Versuches markiert wurden, werden auf das Master-Gel digital übertragen. Es kann nun jedes einzelne Gel mit seinen Protein-Spots mit dem Master-Gel verglichen werden und zwar bzgl. des Vorhandenseins eines Spots und zusätzlich bzgl. seines Densitätsgrades, welcher Rückschlüsse auf die Menge des Proteins in diesem Spot zulässt und damit evtl. Hinweise auf die Regulation der Proteinexpression gibt.

3.6 Massenspektroskopie

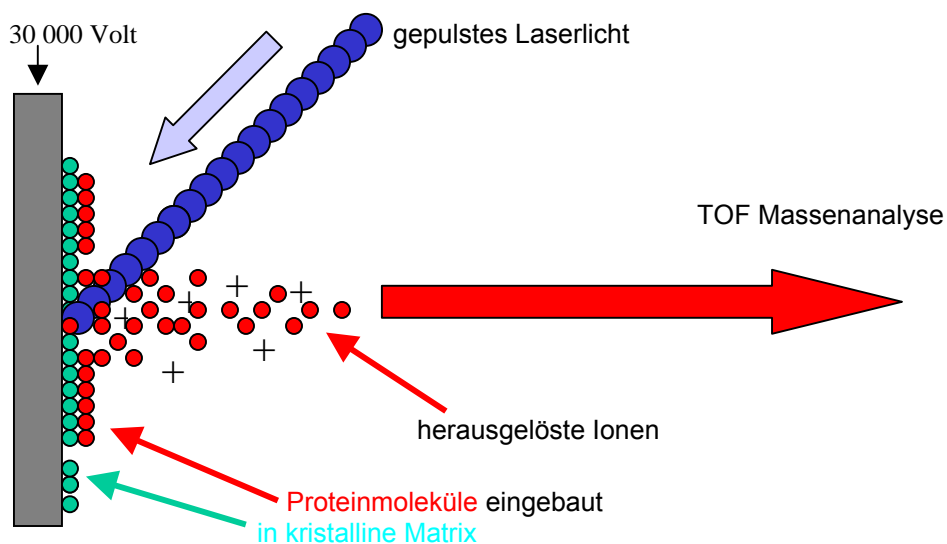
Die ausgewählten Protein-Spots wurden dann aus den Gelen mit Hilfe einer Pipettenspitze per Hand herausgetrennt, in einzelne Tubes mit einer Pufferlösung (je Tube ca. 70µl 20mM Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3) und Azetonitril (ACN) Merck, Darmstadt, Germany, 1:1) gegeben und 30 min bei RT entfärbt. Anschließend wurde die der Überstand abgenommen und verworfen. Dieser Entfärbeschritt wurde wiederholt und die Gelstücke anschließend in offenen Tubes unterm Abzug getrocknet. Als nächster Schritt erfolgte die in-Gel Verdauung durch Zugabe einer Trypsin-Lösung (50 ng/ Probe in 1 mM NH_4HCO_3 , Promega, USA) mind. 5 h bei 37°C. Anschließend wurde zu jedem Tube 1 µl eine 2% TFA-Lösung gegeben und diese für 15 min auf einen Schüttler gestellt.

Die weitere Analyse des Proteinextrakts mit Bestimmung der Proteinmolekülmasse erfolgte mittels einer Matrix-Laser-Ionenquelle (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) und dem Flugzeit-(time-of-flight, TOF)-Massenspektrometer (Ultraflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Hierzu werden die zu untersuchenden Moleküle mit einem Massenanteil in der Größenordnung 1:1000 in eine kristalline Matrix eingebaut. Dann wird

mit Hilfe von Laserimpulsen Energie auf die Matrix gebracht. Durch die Energie des Laserlichts werden Protonen an die zu analysierenden Moleküle übertragen. Die so erzeugten Ionen werden durch Anlegen einer Spannung (30 kV) aus der Matrix aufgrund ihrer Ionisation herausgelöst, beschleunigt und am Ende einer definierten Strecke nachgewiesen (Abb. 3). So kann die Flugzeit (time-of-flight) bestimmt werden, welche wiederum zur Berechnung der einzelnen Molekülmassen benötigt wird. Anhand der auf diese Weise einzeln erstellten Massenspektrogramme („peptide mass fingerprints“) müssen dann, die in der jeweiligen Probe vorherrschenden Peptidmassen nach Abgleich mit speziellen Datenbanken einem Protein zugeordnet werden.

Die Bearbeitung des Proteinextrakts aus den Gel-Spots mit der MALDI-TOF Massenspektroskopie und die anschließende Proteinidentifizierung wurde durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. C. Turck, und hier vor allem von Frau. A. Jacobs, am gleichen Institut durchgeführt.

Abbildung 3: MALDI-TOF Massenspektroskopie



3.7 Pathway Analyse einzelner Proteine

Zusätzlich zu der Analyse ganzer Proteinprofile und deren die Proteinfunktion betreffenden Untergruppierungen legten wir Wert auf die Betrachtung einzelner von uns identifizierter Proteine. Zur Identifizierung möglicherweise für die Pathogenese der MS oder der Wirkung von GA relevanter Proteine aus der großen Gesamtzahl der Proteine wurden alle gefundenen Proteine den folgenden Analyse-Verfahren unterzogen:

1. Vergleich mit Proteintabellen aus veröffentlichten Proteom-Analyse Arbeiten von T- und B-Lymphozyten,
2. ausführliche Internet-Suche in Online-Bibliotheken, wie z.B. Pubmed mit den Stichwörtern T-Zellen, entzündliche Prozesse allgemein, autoimmune Prozesse/Erkrankungen, Multiple Sklerose, EAE, Demyelinisierung, Remyelinisierung, neurotrophe Faktoren
3. PathwayStudio™ Version 4.0 (Ariadne Genomics, Inc., Rockville MD, USA), mit Daten aus der Resnet 4 database (Organismus: Mammal, Version 1.0.0.0)
4. Überprüfung der Funktion, Lokalisation und möglichen Interaktionen mit der Human Protein Reference Database (www.hprd.org) und via NCBI (National Centre for Biotechnology Information) database „protein search“ (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Wenn die in der Literatur beschriebene Funktion und das von uns gefundene Expressionsprofil eines Proteins für die Pathogenese der MS oder der GA-Funktion bedeutsam erschien, wurde das Protein in die Liste der einzeln beschriebenen Proteine übernommen (siehe 5.1).

3.8 Probandenauswahl

Die Patienten mussten an einer gesicherten MS erkrankt sein, einen schubförmig remittierenden Verlaufstyp aufweisen, durften keine weitere immunmodulierende oder immunsuppressive Dauertherapie bis einschließlich 3 Monate vorher einnehmen, ausgenommen die hochdosierte Methylprednisolon Therapie im akuten Schub. Es durften keine Kontraindikationen für die Einnahme von Copaxone® bestehen. Der Einschluß in die Studie wurde erst mit dem Patient besprochen, nachdem dieser durch die freie

Entscheidung, nach Aufklärung über mögliche Alternativen, Copaxone® als zukünftige Therapieform gewählt hatte.

Es fließen die Daten von drei gesunden Probanden und einem MS-Patienten in die Auswertung ein.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung der T-Zell Linien und Prüfung der Ag-Spezifität

Aus dem peripheren Blut wurden insgesamt von jedem der vier Probanden (drei Gesunde, ein MS-Patient) zwischen 45 und 55 Millionen mononukleäre Zellen für den Primäransatz gewonnen. Hieraus wurden jeweils 96 Linien (entspricht einer 96 Well-Platte) mit dem Antigen GA und 96 Linien mit dem Antigen MBP angelegt.

3 Tage nach der ersten Restimulation mit der „Split Well“-Technik wurde durch visuelle Kontrolle von drei verschiedenen Personen die Proliferationsrate und damit indirekt die Antigenspezifität beurteilt. Wells mit nur geringer oder gar keiner Proliferation wurden verworfen.

Ab der 2. Restimulation wurde für jede der T-Zell Linien mittels des ³H-Thymidin Proliferationstests die Ag-Spezifität überprüft. Es wurden nur T-Zell Linien weitergeführt, welche einen Proliferationsindex >3 (Quotient cpm mit Ag / cpm ohne Ag) aufwiesen. Dies ergab bei Proband 1 (MK) 19 GA-spezifische und 16 MBP-spezifische, bei Proband 2 (JH) 18 GA-spezifische und 6 MBP-spezifische, bei Proband 3 (VV) 8 GA-spezifische und 5 MBP-spezifische und beim MS-Patient vor Therapie 14, unter Therapie 10 GA-spezifische T-Zell Linien. Die T-Zell Linien, welche nach der letzten Restimulation den höchsten Proliferationsindex aufwiesen, wurden für die nachfolgende Proteinbestimmung verwendet.

Zwei Beispiele sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: ³H-Thymidin Proliferationstest einer GA-spezifischen T-Zell Linie

GA-2 (MK)	cpm	Mittelwert	StA	Proliferationsindex
ohne Ag	20 27	23,5	4,9	38,9
mit Ag	1157 673	915,0	342,2	

Tabelle 2: ³H-Thymidin Proliferationstest einer MBP-spezifischen T-Zell Linie

MBP-3 (MK)	cpm	Mittelwert	StA	Proliferationsindex
ohne Ag	66 40	53,0	18,4	29,7
mit Ag	1319 1832	1575,5	362,7	

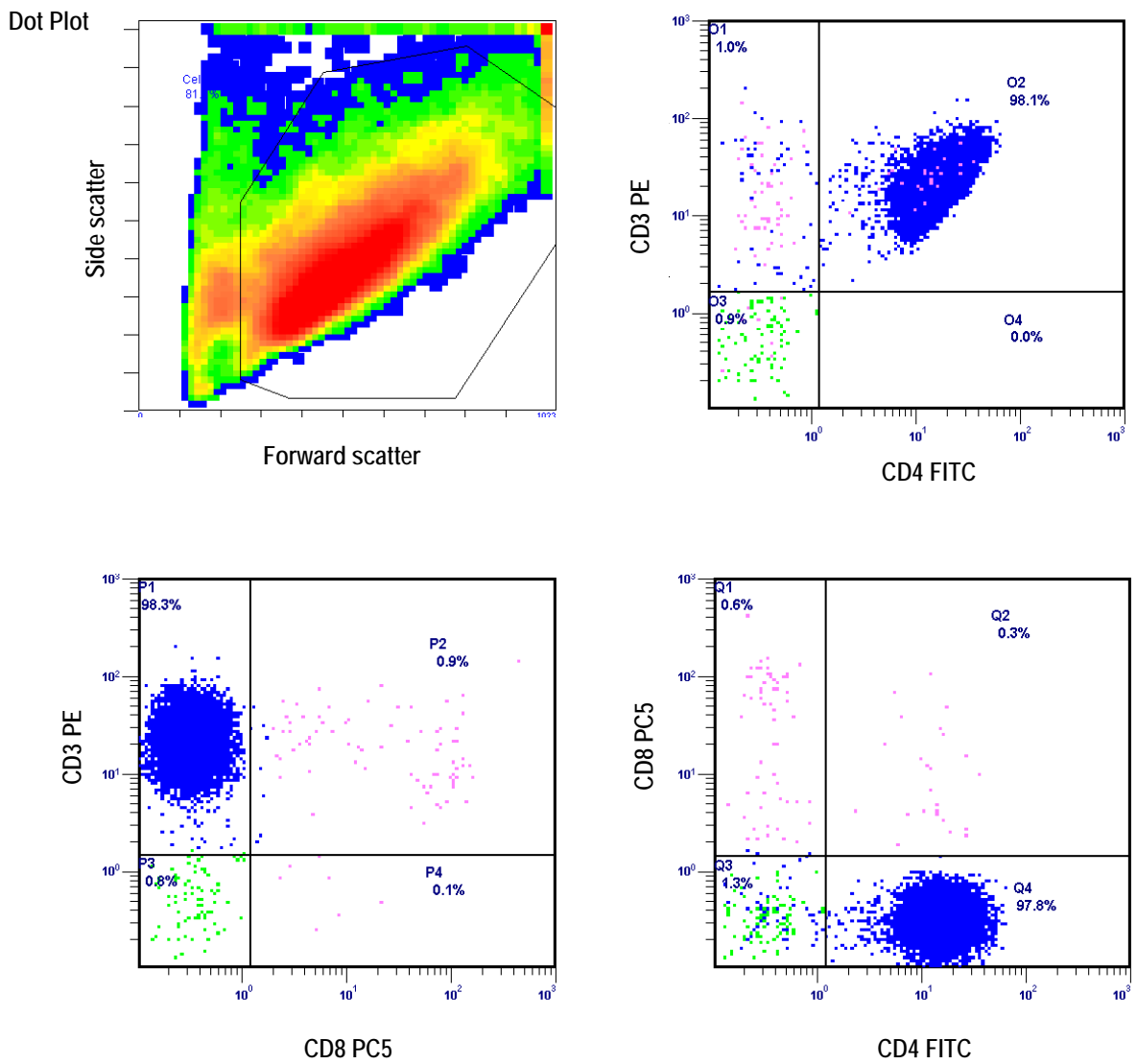
Im Einzelnen sind in den Tabellen (Tab.1 und 2) jeweils zwei Zellproben einer Ag spezifischen T-Zell Linie dargestellt; eine Probe ohne die Zugabe des jeweiligen Ag (ruhende Zellen) und eine Probe mit Ag (aktivierte Zellen). Es wurden pro T-Zell Linie jeweils zwei Messungen durchgeführt, der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung (StA) berechnet.

Den ³H-Thymidin Proliferations-/Ag-Spezifitätstest führten wir nach jeder Restimulation erneut bei jeder einzelnen T-Zell Linie durch, da wir beobachten konnten, dass T-Zell Linien mit zuvor signifikanter Ag-Spezifität nach einer erneuten Restimulation keine bzw. eine deutlich reduzierte Ag-Spezifität besaßen.

4.2 Charakterisierung der Ag-spezifischen T-Zell Linien mittels FACS- Analyse

Nachdem nach mehreren Restimulationen eine ausreichende Zellzahl für die Durchführung der Durchflußzytometrie erreicht war, führten wir mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 eine Typisierung der T-Zell Linien durch. Linien mit einem Anteil von CD4+/CD3+/CD8- Zellen von mehr als 90% wurden durch weitere Restimulationen expandiert.

Abbildung 4: FACS-Analyse einer MBP-spezifischen T-Zell Linie



Histogramm positiver Zellen (rot, grün, violett) und Isotyp-Kontrolle (weiß)

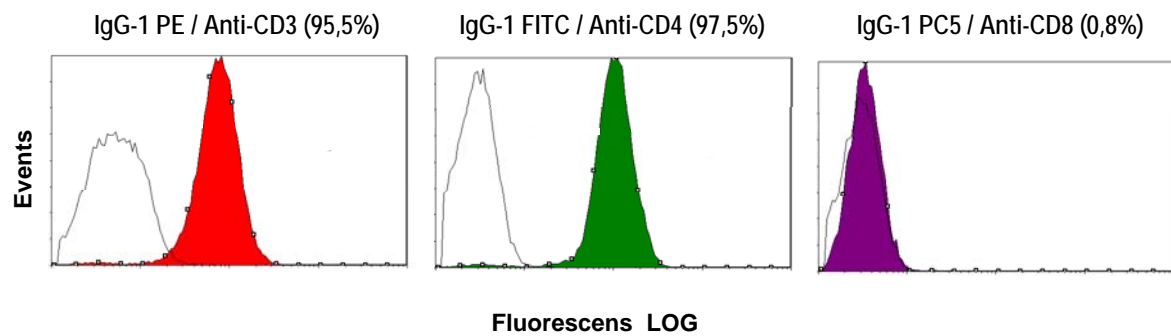
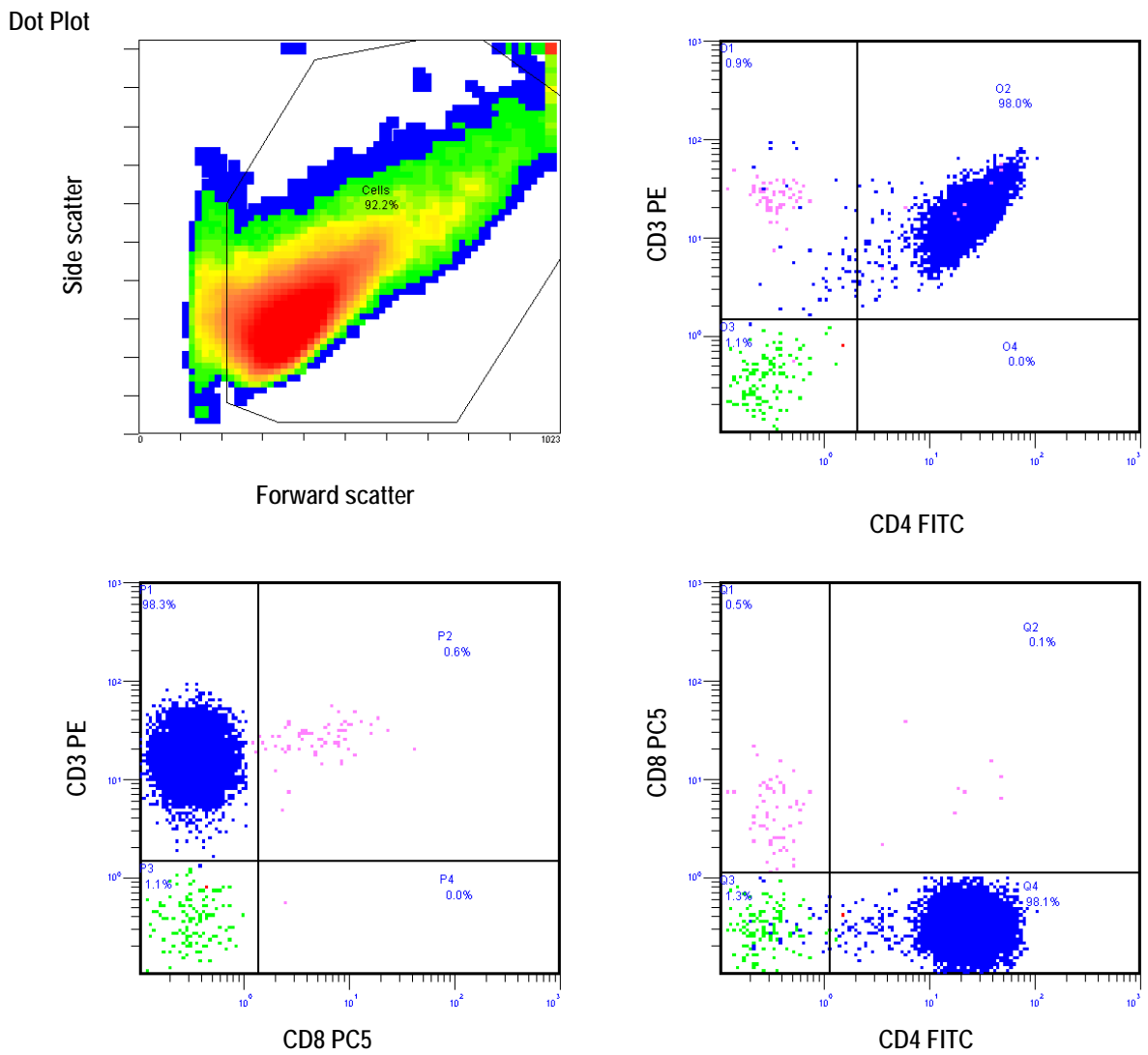
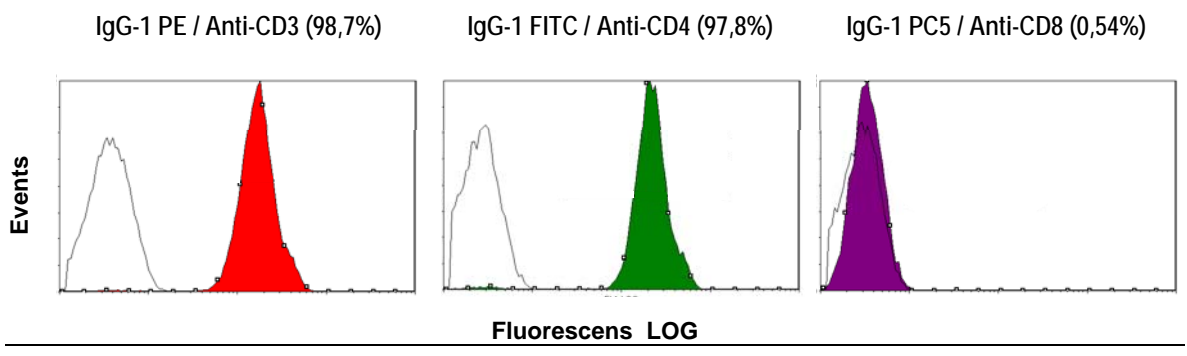


Abbildung 5: FACS-Analyse einer GA-spezifischen T-Zell Linie



Histogramm positive Zellen (rot, grün, violett) und Isotyp-Kontrolle (weiß)



Die FACS-Analyse wurde mit ca. 20 000 Zellen pro Gate durchgeführt, um eine möglichst genaue Charakterisierung der jeweiligen Zell Linie zu ermöglichen (siehe hierzu jeweils die erste Graphik in den Abbildungen 4 und 5). Die Gates wurden in Anbetracht der zu erwartenden Lymphozyten-Populationen gewählt und setzen eine bestimmte Zellgröße und Granulation voraus. Bei dem Cluster im linken unteren Quadranten (außerhalb des Gates), muss aufgrund der Größenskala von Zellresten ausgegangen werden. In den Histogrammen ist die jeweilige Isotyp-Kontrolle neben den zugehörigen, mit FITC, PE oder PC5 gelabelten Anti-CD mAk dargestellt.

Neben dem überwiegenden Teil der Zell Linien mit einer deutlichen CD4+/CD3+/CD8- Ausprägung konnten wir einige Linien mit einem über 90%igen Anteil an CD8+/CD3+/CD4- Zellen identifizieren (diese Daten werden hier nicht aufgeführt).

4.3 Identifizierte Proteine

4.3.1 T-Zell Linien von Probanden

Mit Hilfe des Programms PDQuest™ und der Auswertungsprogramme der Massenspektroskopie war es uns möglich nicht nur zu erkennen, ob ein bestimmtes Protein vorhanden ist, sondern auch, ob ein bestimmtes Protein im Vergleich der definierten Gruppen auf- oder abreguliert erscheint.

Insgesamt konnten 120 regulierte Protein-Spots auf den Gelen in der Massenspektroskopie erfolgreich jeweils einem Protein zugeordnet werden. Dabei stammen 85 Spots aus dem Gelvergleich der GA- und MBP-spezifischen T-Zell Linien der gesunden Probanden, 35 Spots aus dem Gelvergleich der GA-spezifischen T-Zell Linien vor und unter Therapie des MS-Patienten.

Die Auswertung der 120 Protein-Spots ergab dabei insgesamt 69 verschiedene Proteine. Die Gele mit den jeweiligen T-Zell Linien der gesunden Probanden wurden hinsichtlich ihres Proteinprofils abhängig von der Ag-Spezifität (GA oder MBP) und dem Aktivierungsgrad (aktiviert oder ruhend) verglichen und zusätzlich noch in dem Vergleich aktivierte T-Zell Population gegen ruhende T-Zell Population innerhalb einer Ag-Spezifität (Tabelle 3). Ein interpersoneller Vergleich der Proteinprofile einzelner Probanden fand nicht statt. Die Proteinspots der einzelnen Gele eines Vergleiches wurden, wie im Abschnitt 3.5.3 beschrieben, im Vergleich mit einem sogenannten Mastergel ermittelt.

Tabelle 3

Vergleich	Anzahl der regulierten Spots/Proteine	Tab.-No.
MBP+ vs MBP-	30/27	4
GA+ vs GA-	22/19	5
GA+ vs MBP+	28/23	6
GA- vs MBP-	6/6	7

MBP+ = aktivierte MBP-spezifische T-Zellen; MBP- = ruhende MBP-spezifische T-Zellen

GA+ = aktivierte GA-spezifische T-Zellen; GA- = ruhende GA-spezifische T-Zellen

Der Vergleich der **MBP-spezifischen** T-Zell Linien der gesunden Probanden mit Unterschieden in der Proteinexpression von **aktivierten vs. ruhenden** T-Zellen ergab insgesamt 30 unterschiedlich regulierte Protein-Spots (Tab. 4). 23 Protein-Spots zeigten dabei in den aktivierten Zellen gegenüber den ruhenden T-Zellen eine **vermehrte** Expression, 2 Proteine wurden dabei jedoch in jeweils 2 Spots identifiziert i.S. von Isoformen, so dass letztendlich 21 verschiedene Proteine identifiziert werden konnten.

7 Proteine dagegen fanden sich mit einer **reduzierten** Expression in den aktivierten T-Zellen gegenüber den ruhenden T-Zellen.

Die einzelnen Proteine wurden bekannten Funktionsgruppen zugeordnet (Tab. 4).

Dabei wurden in den **aktivierten MBP-spez.T-Zellen** vor allem Proteine folgender Funktionsgruppen aufreguliert:

(I)	Energiestoffwechsel	35%
(II)	Zellwachstum	15%
(III)	Signaltransduktion, Proteindestination, Proteinsynthese, DNS-Metabolismus	
	jeweils	10%
(IV)	Zell-Biogenese	5%
(V)	nicht klassifiziert	5%

Proteine folgender Funktionsgruppen waren in den **aktivierten MBP-spez. T-Zellen herunterreguliert**:

(I)	Zellwachstum	ca. 57%
(II)	Signaltransduktion	ca. 28%
(III)	Zellproliferation	ca. 14%

In der Analyse einzelner Proteine konnten folgende Proteine mit möglicherweise interessanten Eigenschaften hinsichtlich in Frage kommender Pathomechanismen identifiziert werden: *Peroxiredoxin 1* ist aufreguliert in MBP+ T-Zellen, *Gelsolin* ist abreguliert in MBP+ T-Zellen. *Stathmin 1*, ein u.a. microtubulär-destabilisierendes Protein, ist sowohl in GA+ Zellen (im Vergleich GA+ vs. GA-) als auch in MBP+ Zellen (MBP+ vs. MBP-) aufreguliert, so dass hier nicht von einem Ag-spezifisch bedingten Unterschied in der Expression ausgegangen werden kann. Er ist wahrscheinlich vielmehr durch die Zellaktivierung an sich bedingt.

Der Vergleich der **GA-spezifischen** T-Zell Linien der gesunden Probanden mit Unterschieden in der Proteinexpression von **aktivierten vs. ruhenden** T-Zellen ergab insgesamt 22 unterschiedlich regulierte Protein-Spots (Tab. 5).

11 unterschiedliche Proteine zeigten dabei in den aktivierten Zellen gegenüber den ruhenden T-Zellen eine **vermehrte** Expression, 8 Proteine dagegen fanden sich mit einer **reduzierten** Expression in den aktivierten T-Zellen gegenüber den ruhenden T-Zellen. 2 Proteine wurden in mehr als einem Spot identifiziert, namentlich sind dies *Acidic ribosomal protein P0*, in drei Spots vorhanden, und *Proteasome subunit alpha type 2*, in zwei Spots vorhanden. Dies kann bedingt sein durch die verschiedenen Isoformen eines Proteins, welche während der 2D-Gelelektrophorese eine Auftrennung erfahren. Die einzelnen Proteine wurden getrennt nach Aktivitätszustand bekannten Funktionsgruppen (Tab. 5) zugeordnet. Hierbei zeigte sich bei den GA-spezifischen T-Zellen wie bei den MBP-spezifischen T-Zellen eine Aufregulation von Proteinen mit Funktionen im Protein- und Energiestoffwechsel.

Folgende Funktionsgruppen zeigten in den **aktivierten GA-spezifischen T-Zellen eine Aufregulation** :

(I)	Protein- und Energiestoffwechsel	ca. 41%
(II)	Zellwachstum	ca. 16%
(III)	Signaltransduktion, zelluläre Biogenese, Proteindestination, DNS-Synthese und unklassifiziert jeweils	ca. 8%

Folgende Funktionsgruppen waren in den **aktivierten GA-spezifischen T-Zellen abreguliert** :

(I)	Signaltransduktion	40%
(II)	Zellwachstum und –metabolismus	40%
(III)	Transport und unklassifiziert jeweils	10%

Auch in diesem Vergleich zeigt sich die zu erwartende erhöhte Expression von am Protein- und Energiemetabolismus beteiligten Proteinen in den aktivierten T-Zellen. Proteine, die an Signalmechanismen und Zellwachstum beteiligt sind, waren dagegen eher in den aktivierten Zellen im Vergleich zu den ruhenden Zellen niedriger. In der Analyse einzelner Proteine konnten folgende Proteine mit interessanten Eigenschaften identifiziert werden: *Stathmin 1*, auch in MBP+ Zellen (s. MBP+ vs. MBP-) aufreguliert.

Der Vergleich der **GA-spezifischen, aktivierten T-Zellen** mit den **MBP-spezifischen, aktivierten T-Zellen** ergab Unterschiede in der Proteinexpression bei insgesamt 28 Protein-Spots (Tab. 6). 18 dieser Spots zeigten dabei in den MBP-spezifischen T-Zellen eine erhöhte oder erniedrigte Expression gegenüber den GA-spezifischen T-Zellen (15 aufreguliert, 3 abreguliert). Allerdings wurden auch hier einige Proteine in mehr als einem Spot nachgewiesen. So wurden die Proteine *Transcription factor BTF3*, *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3* (hnRNP H3) und *Vinculin* in jeweils 2 Spots auf den MBP+ Gelen gefunden.

10 Protein-Spots konnten mit erhöhter Expression dagegen in den GA-spezifischen T-Zellen gegenüber den MBP-spezifischen T-Zellen identifiziert werden. Die Proteine *Pleckstrin* und *Gelsolin* wurden dabei ebenfalls in jeweils 2 Spots auf den GA+ Gelen identifiziert. Zusätzlich wurden in diesem Vergleich zwei Proteine, namentlich *Inorganic pyrophosphatase* und *Fibrinogen beta chain precursor*, in beiden (GA+ und MBP+) **aktivierten** Ag-spezifischen T-Zell Populationen gefunden, jedoch **nicht** im Ag-spezifischen Vergleich der **ruhenden** T-Zellen (MBP- vs. GA-), *Fibrinogen beta chain precursor* fand sich auch noch aufreguliert in den **aktivierten** T-Zellen des Vergleichs GA+ vs. GA-. Es hat damit den Anschein, dass die vermehrte Expression der Proteine *Inorganic pyrophosphatase* und *Fibrinogen beta chain precursor* durch die Ag-Aktivierung der T-Zellen unabhängig von der Ag-Spezifität bedingt ist. Die einzelnen Proteine wurden, aufgetrennt nach Ag-Spezifität, bekannten Funktionsgruppen zugeordnet (Tab. 6).

Folgende Funktionsgruppen waren **antigenspezifisch** im Vergleich GA+ vs MBP+ aufreguliert:

(I)	Zellwachstum	GA	25%	MBP	8%
(II)	Energie/Metabolismus	GA	25%	MBP	17%
(III)	Proteinmetabolismus	GA	12,5%	MBP	33%
(IV)	Proteindestination	GA	0%	MBP	17%
(V)	DNS-Synthese	GA	0%	MBP	25%
(VI)	Signaltransduktion	GA	12,5%	MBP	0%
(VII)	Funktion unklassifiziert	GA	25%	MBP	0%

In der Analyse einzelner Proteine konnten folgende Proteine mit interessanten Eigenschaften identifiziert werden: *Cyclophilin b* (aufreguliert in MBP+), *Transgelin 2* und *Gelsolin* (aufreguliert in GA+).

Der Vergleich der **GA-spezifischen, ruhenden** T-Zellen mit den **MBP-spezifischen, ruhenden** T-Zellen ergab Unterschiede in der Proteinexpression bei insgesamt 6 Protein-Spots (Tab. 7).

Dabei konnten 6 verschiedene Proteine, welche *ausschließlich* in den **ruhenden GA-spezifischen** T-Zellen eine erhöhte Expression zeigten, identifiziert werden. Die einzelnen Proteine wurden bekannten Funktionsgruppen zugeordnet (Tab. 7).

Folgende Funktionsgruppen waren **GA-spezifisch** im Vergleich GA- vs MBP- aufreguliert:

- | | | |
|-------|---------------------|---------|
| (I) | Energiestoffwechsel | ca. 66% |
| (II) | Signaltransduktion | ca. 16% |
| (III) | Zellwachstum | ca. 16% |

In der Analyse einzelner Proteine konnten folgende Proteine mit interessanten Eigenschaften identifiziert werden: *Annexin 1* und *Thioredoxin peroxidase 2*

In den folgenden Tabellen werden die Proteine im Einzelnen aufgeführt. Neben der Art der Regulation im jeweiligen Vergleich wird noch die Lokalisation und die Proteinfunktion in Kürze angegeben.

4.3.2 Proteintabellen Probanden

Tabelle 4: T-Zell Linien Probanden

Vergleich der Protein Auf-/Abregulation der MBP-spezifischen T-Zell Linien, 5 Tage nach AG-spezifischer Aktivierung (aktiviert) gegen 19 Tage nach AG-spezifischer Aktivierung (ruhend)

Protein	Swiss-Prot/NCBI-Accession-No.	Lokalisation und Funktion
<u>aufreguliert in aktivierten T-Zellen</u>		
Stathmin 1	P16949	Zytoplasma; Zellwachstum, Signaltransduktion, microtubulärdestabilisierend, Wirkung auf Oligodendrozyten Maturation, verhindert Heilung im demyelinisierten Gehirn
ARP2/3 complex 16 kDa subunit 1	O15511	Zytoskelett; Zellwachstum
Acidic ribosomal protein 2	P05387	Ribosomen; beteiligt an Elongation in der Proteinsynthese
Peroxiredoxin 1	Q06830	Zytoplasma; Energiestoffwechsel, Antioxidants, eliminiert Peroxide, Signal-Kaskade der Wachstumsfaktoren und TNF- α , direkte Interaktion mit Interferon regulatory factor 3
Proteasome subunit alpha type 2	P25787	Zytoplasma, Nucleus; Proteindegradation, beteiligt an ATP/ubiquitin-abhängigen proteolytischen Prozessen
CArG binding factor	Q6SPF2	Nucleus; zelluläre Biogenese
Vimentin p	P08670	Zytoskelett; Zellwachstum, stark exprimiert in Fibroblasten, gering in T- and B-Zellen, Intermediär Filament;
hnRNP-H 2	P31943	Nucleus; Ribonucleoprotein, DNS-Metabolismus
hnRNP-H3 2	P31942	(Isoform)
Acidic ribosomal protein P0	P05388	Ribosomen; Proteinmetabolismus
Acidic ribosomal protein P0	P05388	(Isoform)
Glutathione S-transferase (3) P	P09211	Zytoplasma, Nucleus; Detoxification, Energiestoffwechsel
Transcriptionfactor BTF3	Q76M56	Nucleus; Transcriptionsfactor, Transcriptionsregulation
Transcriptionfactor BTF3	Q76M56	(Isoform)
Phosphoglycerate mutase 1	P18669	Zytoplasma; Glykolyse, katalyt. Aktivität, Energiestoffwechsel
Triosephosphate isomerase	P60174	Zytoplasma; Energiestoffwechsel, Fehlen führt zu autosomal rezessiver Erkrankung mit chronischer, hämolyt. Anämie und neuromuskulärer Funktionsstörung
Rho GDP dissociation inhibitor 2	P52566	Zytoplasma; Signaltransduktion
PAF ³ acetylhydrolase 1b	P68402	Zytoplasma; Energiestoffwechsel

Fortsetzung Tab. 4

dUTP diphosphatase	P33316	Nucleus, Mitochondrien; Nucleotidmetabolismus
Proteasome subunit beta type 1	P20618	Zytoplasma, Nucleus; Proteindestination.
Inorganic pyrophosphatase	Q15181	Zytoplasma; katalytische Aktivität, Energiestoffwechsel
Hypothetical protein	Q9H3X0	(DKFZp761L1216) unbekannt
NM23-H1 ⁴	AAO85436	Zytoplasma; katalytische Aktivität, Energiestoffwechsel.

abreguliert in aktivierten T-Zellen

F-actin capping protein alpha-2	P47755	Zytoplasma; Zellwachstum, Zytoskelett; Aktin-modulierend
Actin gamma 1 propeptide	NP_001605	Zytoplasma, Zytoskelett; Zellwachstum
Vinculin p	P18206	Zytoskelett, Zellmembran; Zellwachstum, Zelladhäsion und evtl. Lokomotion
Ras suppressor protein 1	NP_036557	Zytoplasma; Signaltransduktion, Zelladhesion
Manganese superoxide dismutase	CAA32502	Mitochondrien; Zellproliferation
Pleckstrin	P08567	Plasmamembran; Signaltransduktion, Zellkommunikation
Gelsolin	P06396	Zytoplasma; Zellwachstum, Aktin-modulierend, anti-apoptotische Aktivität durch Blockade mitochondrialer VDAC ⁵

1 Actin related protein 2/3 complex 16 kDa subunit
 2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
 3 Platelet activating factor
 4 Nonmetastatic protein 23, homolog 1
 5 Voltage dependent anion channel

Tabelle 5: T-Zell Linien Probanden

Vergleich der Protein Auf-/Abregulation der GA-spezifischen T-Zell Linien, 5 Tage nach AG-spezifischer Aktivierung (aktiviert) gegen 19 Tage nach AG-spezifischer Aktivierung (ruhend)

Protein	Swiss-Prot/NCBI-Accession-No.	Lokalisation und Funktion
---------	-------------------------------	---------------------------

aufreguliert in aktivierten T-Zellen

Acidic ribosomal protein P0	P05388	Ribosomen; Proteinmetabolismus
Acidic ribosomal protein P0	P05388	(Isoform)
Acidic ribosomal protein P0	P05388	(Isoform)
Acidic ribosomal protein P2	P05387	Zytoplasma, Nucleus; Proteinmetabolismus

Fortsetzung Tab. 5

Fibrinogen beta chain precursor	P02675	ER ¹ , extrazellulär; Proteinmetabolismus, sezerniertes Protein. Cofactor der Thrombozytenaggregation
Rho GDP dissociation inhibitor 2	P52566	Zytoplasma; Signaltransduktion, Rho protein
Stathmin 1	P16949	Zytoplasma; Zellwachstum und Signaltransduktion, microtubulär-destabilisierend, Wirkung auf Oligodendrozyten Maturation, verhindert Heilung im demyelinisierten Gehirn
ARP2/3 complex 16 kDa subunit ²	O15511	Zytoskelett; Zellwachstum
NM23-H1 ³	AAO85436	Zytoplasma; Energiestoffwechsel, katalytische Aktivität
hnRNP-H3 ⁴	P31942	Nucleus; DNA-Metabolismus, beteiligt an splicing Prozessen
Hypothetical protein	Q9H3X0	(DKFZp761L1216) unbekannt
Proteasome subunit alpha type 2	P25787	Zytoplasma und Nucleus; Proteindestination; beteiligt an ATP/ubiquitin-abhängigen proteolytischen Prozessen
Proteasome subunit alpha type 2	P25787	(Isoform)
CAR binding factor	Q6SPF2	Nucleus; Zellmetabolismus

abreguliert in aktivierten T-Zellen

Galectin-3	P17931	Zytoplasma, Nucleus; DNA-Metabolismus evtl. beteiligt an innater/adaptiver Immunität durch Mitwirkung an Phagozytose von Mikroorganismen und apoptotischen Zellen, Galaktose-/IgE- bindendes Lectin
Manganese superoxide dismutase	CAA32502	Mitochondrien; Zellproliferation
Hypothetical protein	Q7Z3V0	(DKFZp686M0959) unbekannt
Annexin 1 (Lipocortin 1)	P04083	Plasmamembran; Signaltransduktion, inhibiert Phospholipase A2 Aktivität, wirkt antiinflammatorisch
VDAC ⁵	P45880	Zytoplasma, Mitochondrien; Transport
Rho GDP dissociation inhibitor	P52566	Zytoplasma; Signaltransduktion, Rho protein
F-actin capping protein α 2 subunit	P47755	Zytoskelett; Zellwachstum, Aktin-modulierend
Ras suppressor protein 1	Q15404	Zytoplasma; Signaltransduktion, Zelladhesion

1 Endoplasmatisches Retikulum

2 Actin related protein 2/3 complex 16 kDa subunit

3 Nonmetastatic protein 23, homolog 1

4 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H

5 Voltage dependent anion channel

Tabelle 6: T-Zell Linien Probanden

Vergleich der Protein Auf-/Abregulation der GA- vs. MBP-spezifischen T-Zell Linien, 5 Tage nach AG-spezifischer Aktivierung (aktiviert)

Protein	Swiss-Prot/NCBI-Accession-No.	Lokalisation und Funktion
<u>aufreguliert in MBP-spezifischen T-Zellen</u>		
PAF ¹ - acetylhydrolase 1b	P68402	Zytoplasma; katalytische Aktivität, Energiestoffwechsel
dUTP pyrophosphatase	P33316	Nucleus, Mitochondrien; de novo Synthese von Thymidylat, als Enzym involviert in DNS-Metabolismus
Cyclophilin b	GI:1310882	ER ² u.a.; Chaperon, Proteinmetabolismus, direkte Interaktion mit Interferon regulatory factor 3
Fibrinogen beta chain precursor	P02675	ER ² , extrazellulär; Proteinmetabolismus, sezerniertes Protein, Cofaktor der Thrombozytenaggregation
ER ² protein ERp29	P30040	ER ² ; Chaperon, Proteinsynthese, beteiligt an Herstellung von sekretorischen Proteinen
Inorganic pyrophosphatase	Q15181	Zytoplasma; katalytische Aktivität, Energiestoffwechsel
F-actin capping protein alpha-1	P52907	Zytoplasma; Zellwachstum, Aktin-modulierendes Protein
hnRNP-H3 ³	P31942	Nucleus; beteiligt an splicing-Prozessen, DNS-Metabolismus
hnRNP-H3 ³	P31942	(Isoform)
Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	Zytoplasma; Proteinmetabolismus
T-complex protein 1, beta subunit	Q6IAT3	Zytoplasma; Chaperone, Proteinmetabolismus
Transcription factor BTF3	Q76M56	Nucleus; benötigt für die Initiierung der Transkription
Transcription factor BTF3	P20290	(Isoform)
Proteasome subunit beta type 1	P20618	Zytoplasma, Nucleus; Proteindestination, beteiligt an ATP/Ubiquitin-abhängigen proteolytischen Prozessen
Proteasome subunit beta type 2	P49721	Zytoplasma, Nucleus; s. Proteasome subunit beta type 1
<u>aufreguliert in GA-spezifischen T-Zellen</u>		
Inorganic pyrophosphatase	Q15181	Zytoplasma; katalytische Aktivität, Energiestoffwechsel
Transgelin 2	P37802	ubiquitär; neu entdeckt in B-Lymphozyten, Funktion unbekannt
Hypothetical protein	Q9H3X0	(DKFZp761L1216) unbekannt

Fortsetzung Tab. 6

Carbonic anhydrase II	NP_000058	Zytoplasma; Energiestoffwechsel, katalytische Aktivität u.a. reversible Hydratation von CO ₂ , Defekte assoziiert mit Osteoporose und renaler tubulärer Azidose.
Actin gamma 1 propeptide	NP_001605	Zytoplasma, Zytoskelett; Zellwachstum
Fibrinogen beta chain precursor	P02675	ER ² , extrazellulär; Proteinmetabolismus, sezerniertes Protein, Cofaktor der Thrombozytenaggregation
Pleckstrin	P08567	Plasmamembran; Signaltransduktion, Zellkommunikation, Proteinkinase in Thrombozyten
Pleckstrin	P08567	(Isoform)
Gelsolin	P06396	Zytoplasma, extrazellulär; Zellwachstum, Aktin-modulierend, durch Inhibierung der mitochondrialen VDAC ⁴ anti-apoptotisch
Gelsolin	P06396	(Isoform)

abreguliert in MBP-spezifischen T-Zellen

Actin gamma 1 propeptide	NP_001605	Zytoplasma; Zellwachstum, Hauptkomponente des Zytoskeletts von Muskelzellen und Nichtmuskelzellen, Mikrofilamente, lineare Aktin-Polymere sind beteiligt an Zellbeweglichkeit, Organellentransport, Zytokinese und Muskelkontraktion
Vinculin p	P18206	Zellmembran; Zytoskelett, Zellwachstum, Zell-Zell junction, beteiligt an der Zelladhäsion und evtl. an der Zell-Fortbewegung
Vinculin p	P18206	(Isoform)

1 Platelet activating factor
 2 Endoplasmatisches Retikulum
 3 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3
 4 Voltage dependent anion channel

Tabelle 7: T-Zell Linien Probanden

Vergleich der Protein Auf-/Abregulation der GA- vs. MBP-spezifischen T-Zell Linien, 19 Tage nach Ag-spezifischer Aktivierung (ruhend)

Protein	Swiss-Prot/NCBI-Accession-No.	Lokalisation und Funktion
<u>aufreguliert in GA-spezifischen T-Zellen</u>		
ARPC 16kDa ¹	NP_005708	Zytoskelett; Zellwachstum
Triosephosphate isomerase	P60174	Zytoplasma; Energiestoffwechsel, Fehlen führt zu autosomal rezessiver Erkrankung mit chronischer, hämolyt. Anämie und neuromuskulärer Funktionsstörung
PGAM1 ²	P18669	Zytoplasma; Zell- Energiestoffwechsel, Glykolyse
Peroxiredoxin 2	Q17172	Zytoplasma, Plasmamembran; Energiestoffwechsel
Annexin 1 (Lipocortin I)	P04083	Plasmamembran; Signaltransduktion, inhibiert die Phospholipase A2 Aktivität, wirkt antiinflammatorisch
Alpha enolase	AAB88178	Zytoplasma u.a.; Energiestoffwechsel, katalytische Aktivität

1 Actin related protein complex 16kDa

2 Phosphoglycerate mutase 1

4.3.3 T-Zell Linien des MS-Patienten

Bei den T-Zell Linien des MS-Patienten fanden folgende Vergleiche statt:

Tabelle 8

Vergleich	Anzahl der regulierten Spots/Proteine	Tab.-No.
GA+ vor Therapie vs GA+ unter Therapie	22/22	9
GA- vor Therapie vs GA- unter Therapie	13/13	10

GA+ = aktivierte GA-spezifische T-Zellen; GA- = ruhende GA-spezifische T-Zellen

Der Vergleich der aktivierten **GA-spezifischen T-Zellen** des MS-Patienten ergab 11 Proteine, die nur in den **aktivierten** T-Zellen **vor** Therapie aufreguliert waren und 11 Proteine, die nur in den **aktivierten** T-Zellen **unter** Therapie aufreguliert waren - d.h. keines dieser Proteine fand sich in der jeweils anderen Gruppe wieder und keines der Proteine wurde in mehreren Protein-Spots je Gel i. S. von Isoformen gefunden. In jeder Gruppe fand sich jeweils ein *hypothetisches Protein*, d.h. dass diese Peptidsequenz bisher keinem bekannten Protein zugeordnet werden kann, also auch die evtl. biologische Funktion unbekannt ist. Die einzelnen Proteine wurden bekannten Funktionsgruppen zugeordnet (Tab. 9). Dabei fiel auf, dass vor Therapie (vTh) die Aufregulation einer Proteingruppe mit Energie-metabolischen Eigenschaften mit ca. 36% der Gesamt-Proteinanzahl (22 Proteine) dominierte (unter Therapie nur ca. 18%), unter Therapie (uTh) dagegen die Aufregulation einer Proteingruppe mit zytoskelettalen Funktionen mit ca. 36% (vor Therapie 0%) dominierte.

Die Zuteilung der verbleibenden Proteine des Vergleichs der aktivierten GA T-Zellen vor vs unter Therapie in Funktionsgruppen ergab folgendes:

(I)	Energiestoffwechsel	vTh	ca. 36%	uTh	ca. 18%
(II)	Zytoskelett	vTh	0%	uTh	ca. 36%
(III)	Signaltransduktion	vTh	ca. 18%	uTh	ca. 9%
(IV)	Zellproliferation	vTh	9%	uTh	9%
(V)	Proteinmetabolismus	vTh	ca. 18%	uTh	ca. 9%
(VI)	Proteindestination	vTh	0%	uTh	9%
(VII)	unklassifizierte Funktion	vTh	18%	uTh	9%

In der Analyse einzelner Proteine erschienen uns folgende Proteine besonders erwähnenswert. *Prohibitin* und *Purine nucleoside phosphorylase* zeigten in den **aktivierten** T-Zellen generiert **unter** der Therapie mit GA eine erhöhte Expression - *Peroxiredoxin 3* im Gegensatz dazu in den **aktivierten** T-Zellen generiert **vor** der GA-Behandlung,.

Der Vergleich der **GA-spezifischen T-Zellen** des MS-Patienten mit Unterschieden in der Proteinexpression **vor/unter Therapie** ergab für die **ruhenden** T-Zellen **vor** Therapie 13 aufregulierte Proteine. Aufgrund einer Kontamination der Proben konnten die aufregulierten Protein-Spots, die aus den ruhenden, **unter** Therapie generierten GA-spezifischen T-Zellen des MS-Patienten isoliert wurden, in der Massenspektroskopie nicht identifiziert werden. Es fand sich auch hier in den **vor** Therapie generierten T Zellen ein Vertreter der Peroxiredoxine, das *Peroxiredoxin 2*, aufreguliert (in den **aktivierten** GA-spezifischen T-Zellen **vor** Therapie war *Peroxiredoxin 3* aufreguliert). Die einzelnen Proteine wurden bekannten Funktionsgruppen zugeordnet (Tab. 10).

Folgende Funktionsgruppen waren in den **ruhenden** GA Zellen **vor** Therapie aufreguliert:

(I)	Zellwachstum	ca. 46%
(II)	Signaltransduktion	ca. 23%
(III)	Energie-/Proteinmetabolismus	ca. 30%

In der Analyse einzelner Proteine erschienen uns *Peroxiredoxin 2* und *S100 calcium binding protein* besonders erwähnenswert.

In den folgenden Tabellen werden die Proteine im Einzelnen aufgeführt. Neben der Art der Regulation im jeweiligen Vergleich wird noch die Lokalisation und die Proteinfunktion in Kürze angegeben.

4.3.4 Proteintabellen MS-Patient

Tabelle 9: T-Zell Linien MS Patient

Vergleich der Protein-Aufregulation GA-spezifischer T-Zell Linien vor Therapie zu GA-spezifischen T-Zell Linien unter Therapie, 5 Tage nach Ag-spezifischer Aktivierung (aktiviert)

Protein	Swiss-Prot/NCBI-Accession-No.	Lokalisation und Funktion
<u>aufreguliert vor Therapie</u>		
Glutathione transferase	NP_000843	Zytoplasma; Energiestoffwechsel, Detoxifikation
Peroxiredoxin 3	AAI11398	Mitochondrien; Energiestoffwechsel, Detoxifikation
GrpE like protein co-chaperon	NP_079472	Mitochondrien; Proteinmetabolismus, Membran-Translokation
RAB11B, RAS family	NP_004209	Nucleus, Membran; Signaltransduktion
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	NP_004484	Mitochondrien, ER ¹ ; Energiestoffwechsel, katalytische Aktivität
Mitotic check point protein	NP_004716	Zytoplasma, Nucleus; Signaltransduktion
BCL2 associated athanogene 2	NP_004273	Nucleus; antiapoptose Aktivität, Zellproliferation, Adaptermolekül
Enolase 1 (alpha)	AAH50642	Zytoplasma, Plasmamembran, Nucleus; Energiemetabolismus, identifiziert als das Autoantigen der Hashimoto Enzephalopathie
Eukaryotic translation initiation factor 3	NP_003746	Zytoplasma; Proteinmetabolismus, Translationregulator
SERPINE1 mRNA binding protein	NP_056455	Zytoplasma, Nucleus; DNA-Synthese
Tetratricopeptide repeat protein 12	NP_060338	unbekannt
<u>aufreguliert unter Therapie</u>		
Rho GDP dissociation inhibitor	P52565	Zytoplasma; Signaltransduktion, Rho protein
Vimentin	NP_003371	Zytoskelett; Zellwachstum, Intermediate filament
Prohibitin	NP_002625	ER ¹ u.a.; Zellkommunikation, Signaltransduktion, negativer Regulator in der Zellproliferation
Actin gamma 1 propeptide	NP_001605	Zytoplasma; Zellwachstum, Zytoskelett
Similar to thioredoxin like protein	XP_088476	unbekannt
F-actin capping protein α -2 subunit	P47755	Zytoskelett; Zellwachstum, Aktin-modulierend

Fortsetzung Tab. 9

Lactate dehydrogenase B	NP_002291	Zytoplasma; Energiestoffwechsel, katalytische Aktivität
Mitochondrial intermediate peptidase	NP_005923	Mitochondrien; Proteinmetabolismus, interagiert mit Frataxin, Frataxin Missfunktion führt zu Friedreich Ataxie
Proteasome 26s ATPase subunit 2	NP_002794	Zytoplasma, Nucleus; Proteinmetabolismus
Purine nucleoside phosphorylase	NP_00026	Zytoplasma; Energiestoffwechsel, Enzym, Katabolismus und Recycling von Nukleotiden
NSFL1 cofactor p47	NP_061327	Nucleus, Zytoplasma; Zellwachstum, Funktion unbekannt

1 Endoplasmatisches Retikulum

Tabelle 10: T-Zell Linien MS Patient

Vergleich der Protein-Aufregulation GA-spezifischer T-Zell Linien vor Therapie zu den GA-spezifischen T-Zell Linien unter Therapie, 19 Tage nach Ag-spezifischer Aktivierung (ruhend)

Protein	Swiss-Prot/NCBI-Accession-No.	Lokalisation und Funktion
<u>aufreguliert vor Therapie</u>		
S100 calcium binding protein A11	P31949	Zytoplasma; Signaltransduktion, gliales (Astrozyten) Protein mit antiproliferativen und neurotrophen Eigenschaften, vermehrt exprimiert bei Entzündung
Ubiquitin –conjugating enzyme E2N	NP_003339	Nucleus; Proteinmetabolismus, spielt eine Rolle in DNS-Postreplikation-Reparatur-Mechanismen
Peroxiredoxin 2	P32119	Zytoplasma, Plasmamembran; Energiestoffwechsel, Detoxifikation, Wachstumsfaktorregulation
Lysophospholipase isoform I	O75608	ER1; Energiestoffwechsel, wirkt auf biologische Membranen durch Regulierung von Lysophospholipiden (LysoPLs). Erhöhte Konzentrationen von LysoPL bei Atherosklerose, Hyperlipidämie
F-actin capping protein beta subunit	P47757	Zytoplasma; Zellwachstum, Zytoskelett, Aktin-modulierend
F-actin capping protein α-1 subunit	P52907	Zytoplasma; Zellwachstum, Zytoskelett, Aktin-modulierend
HCC1	P82979	Nucleus, Zytoplasma; unklassifiziert, evtl. Zellwachstum
Glutathione S-transferase alpha 3	NP_000838.3	Zytoplasma; Energiestoffwechsel, Detoxifikation

Fortsetzung Tab. 10

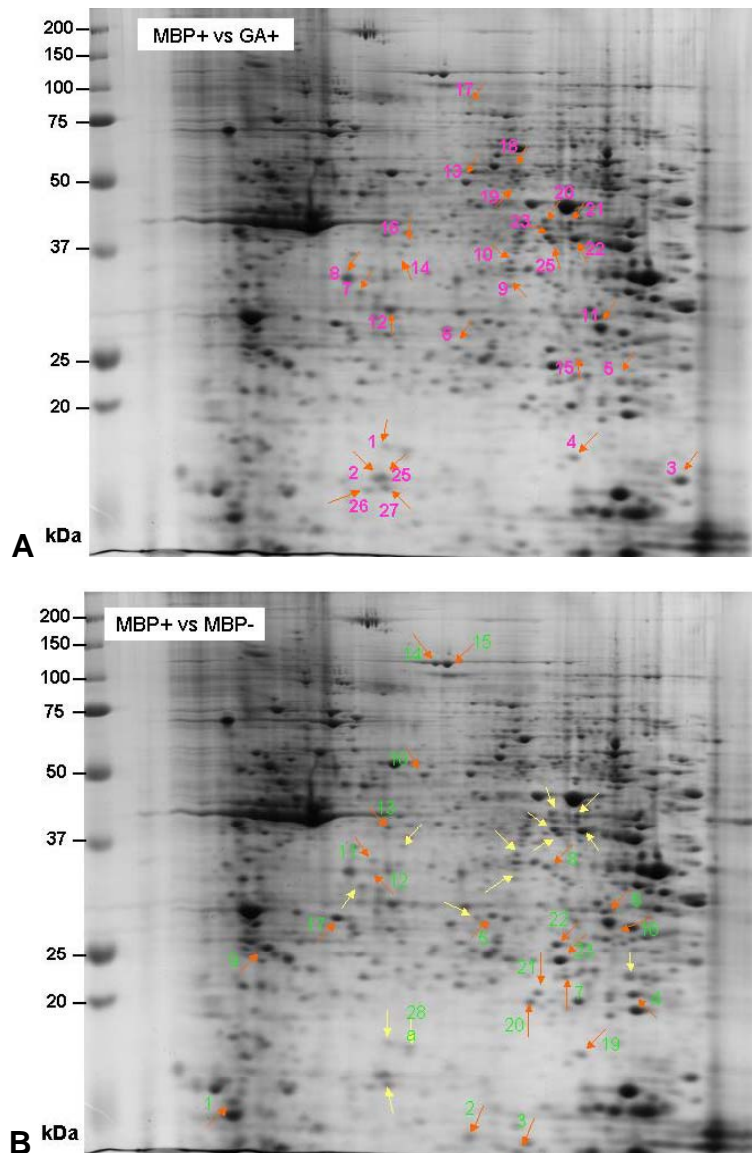
Annexin (Lipocortin I)	P04083	Plasmamembran; Signaltransduktion, inhibiert Phospholipase A2 Aktivität, wirkt antiinflammatorisch
Actin	P30161	Zytoskelett, Zytoplasma; Zellwachstum
Zyxin	Q96AF9	Plasmamembran; Zell-Adhäsion, Signaltransduktion
Mesoderm development candidate 2	Q14696	ER ¹ ; Zellwachstum, Chaperonaktivität
Macrophage capping protein	P40121	Zytoplasma; Zellwachstum, gehört zur Gelsolin-Familie

1 Endoplasmatisches Retikulum

4.4 Gel-Übersicht

4.4.1 Mastergele (Auswahl/Beispiele)

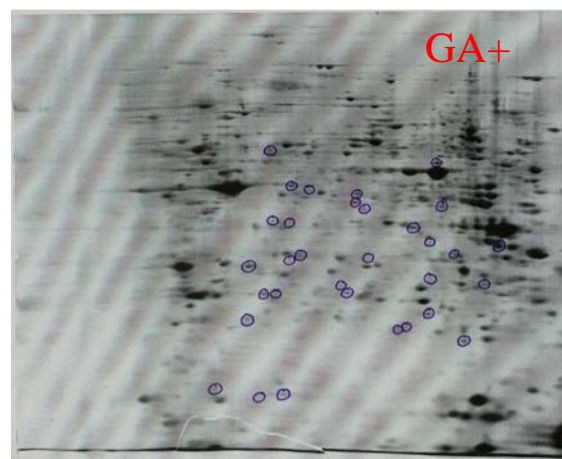
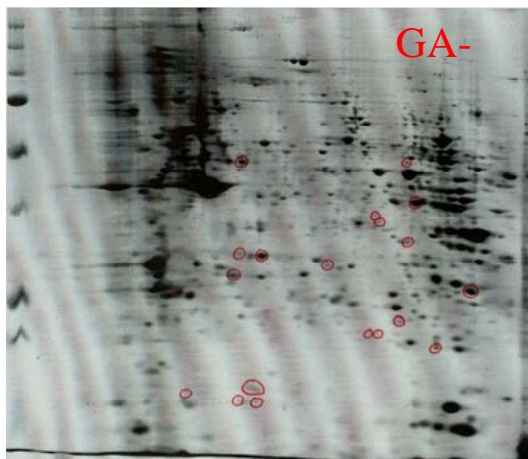
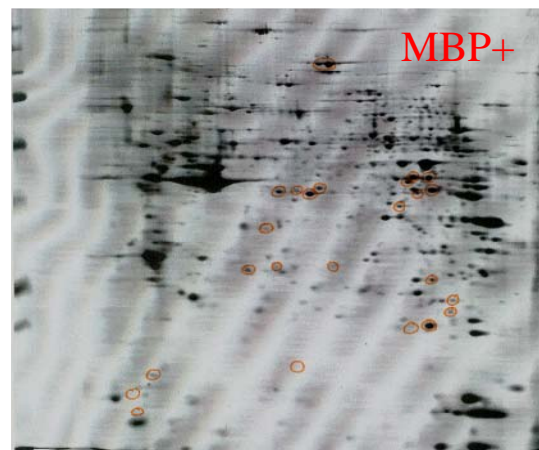
Als erstes Beispiel (A) ist das Mastergel des Vergleiches der Einzelgele der T-Zell Linien MBP+ und GA+ der gesunden Probanden dargestellt. Wie bereits beschrieben, konnten in diesem Vergleich 28 Spots mit einer unterschiedlichen Expression ermittelt werden (Pfeile).



In dem 2. hier dargestellten Mastergel (B) sind die Spots des Vergleichs MBP+ vs MBP- markiert, insgesamt 30 Spots.

4.4.2 Gele einzelner T-Zell Linien

Übersicht über Gele mit den Proteinspots der T-Zell Linien der gesunden Probanden, beschriftet mit der jeweiligen Ag-Spezifität und dem Aktivierungszustand der T-Zell Linie vor Lysierung (+ für zuvor mit Ag stimulierte Linie, - für zuvor nicht stimulierte Linie).



5. Diskussion

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Split-Well Methode T-Zell Linien mit dem Phenotyp CD3+/CD4+/ CD8- und einer Ag-Spezifität für die Antigene MBP und GA aus dem peripheren Blut von gesunden Probanden und einem MS-Patienten in ähnlicher Frequenz erfolgreich isoliert werden können. Erstmals wurde nach unserem derzeitigen Wissen die Proteomanalyse von GA- und MBP-spezifischen T-Zellen mittels 2D SDS-PAGE und Massenspektroskopie durchgeführt.

Dass die Charakterisierung der T-Zell Linien hinsichtlich ihres Phenotypes mittels der Durchflußzytometrie in unserer Arbeit unverzichtbar war, zeigte sich in einem für uns unerwarteten FACS-Ergebnis. Neben dem Großteil an CD3+/CD4+/ CD8- T-Zell Linien wurden auch vereinzelt sowohl GA-spezifische als auch MBP-spezifische T-Zell Linien mit dem CD3+/CD4-/ CD8+ Phenotyp generiert.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente gliedern sich in zwei Teile.

Im ersten Teil war es Ziel antigenspezifisch regulierte Proteine von GA- und MBP-spezifischen T-Zellen zu identifizieren, um einen Hinweis zu bekommen, über welche Mechanismen auf Proteinebene GA-spezifische T-Zellen den nachgewiesenen protektiven Effekt bei der MS bewirken und wie GA den vorbeschriebenen TH-Zell-Shift von dem proinflammatorischen TH1- hin zum antiinflammatorischen TH2-Phenotyp auslöst. Zusätzlich kann in diesem Ansatz auch eine Beurteilung des MBP-spezifischen Proteinprofils von T-Zellen erfolgen, um Aufschluss zu erhalten, welche Proteine in den pathogenen/enzephalitogenen Mechanismen der MBP-spezifischen T-Zellen eine Rolle spielen. Hierzu wurden zu Beginn der Untersuchung die antigenspezifischen T-Zell Linien von gesunden Probanden generiert.

Im zweiten Teil ging es darum, T-Zellen von MS-Patienten mit der Ag-Spezifität für GA auf ihr Proteinprofil zu untersuchen und zwar in dem Vergleich von T-Zellen generiert vor GA-Therapie zu T-Zellen generiert unter 6-monatiger Therapie mit GA. Ziel war es hier, Proteine zu identifizieren, welche unter der ausreichend langen Therapie mit GA in vivo, eine Modulation erfahren hatten, um so evtl. GA-bedingten Veränderungen im Proteinprofil der T-Zellen auf die Spur zu kommen. Auch in diesem Ansatz erhofften wir uns damit Rückschlüsse auf evtl. Beteiligungen von bestimmten Proteinen an Wirkmechanismen des in der MS-Therapie erfolgreich eingesetzten, immunmodulatorischen Wirkstoffs GA ziehen zu können.

Insgesamt wurden in der Proteomanalyse der Ag-spezifischen T-Zell Linien mittels SDS-PAGE in Kombination mit der MALDI-TOF-Massenspektroskopie 120 Proteinspots mit Unterschieden in der Expression identifiziert. Diese 120 Proteinspots konnten 69 verschiedenen Einzelproteinen zugeordnet werden.

Hierzu muss erwähnt werden, dass nicht alle auf den Gelen vorhandenen Protein-Spots identifiziert wurden. Es wurden vielmehr nur diejenigen Spots ausgewählt, die einen Unterschied in der Densität der Spots (auf die Gele bezogen) bzw. in der Expression (auf die Proteine bezogen) gegenüber den korrespondierenden Protein-Loci auf den anderen Gelen eines Vergleiches zeigten. Das heißt, dass korrespondierende Protein-Spots eines Proteins auf den verschiedenen Gelen eines Vergleiches, die keine Unterschiede in der Expression aufwiesen, in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt wurden und somit auch eine Identifizierung mit Hilfe der Massenspektroskopie ausblieb. Damit sind die Proteinprofile jeder von uns generierten T-Zell Linie nach Festlegung der Vergleichskonstellation durch das Auswertprogramm PDQuest erstens nicht mehr beliebig direkt untereinander vergleichbar und zweitens auch nicht direkt vergleichbar mit bereits mittels Proteomics-Methode ermittelten Proteindateien von TH-Zellen allgemein, bei denen keine Differenzierung in Ag-Spezifität der T-Zellen stattfand (siehe hierzu Nyman et al. 2001 und Rautajoki et al. 2004). Zusätzlich können Unterschiede in den von uns ermittelten Proteinprofilen im Vergleich zu Proteindateien aus anderen Arbeiten u.a. auch methodisch bedingt sein. Im Gegensatz zu unserem Ansatz mit Coomassie-Blue, wurde z.B. in der genannten Veröffentlichung von Rautajoki et al. (2004), zur Färbung der Protein-Spots eine Silberlösung verwendet. Bisher gibt es noch kein einheitlich standardisiertes Proteomics-Protokoll, das eine festgelegte Kombination aus SDS-PAGE und Massenspektroskopie vorgibt. Ein Vergleich von Proteom-Daten ist daher zwischen verschiedenen Laboratorien oft nur sehr eingeschränkt bzw. nur nach einem sehr genauen Abgleich der Methodik möglich (Bradshaw and Burlingame 2005, Görg and Weiss et al. 2004).

Die Auswertung unserer Ergebnisse muss daher auf die von uns zu Anfang festgelegten Vergleichskonstellationen beschränkt bleiben. Die Aufarbeitung mittels der für jeden Vergleich erstellten prozentual zueinander dargestellten Proteinfunktionsgruppen ergab für die meisten Vergleiche keine richtungsweisenden Ergebnisse. Einzig der Vergleich der aktivierten GA-spezifischen T-Zellen des MS-Patienten vor vs. unter Therapie, ergab einen deutlichen Unterschied in der Expression von mehreren, einer Funktionsklasse zugehörigen Proteinen. Dabei fiel auf, dass vor Therapie die Aufregulation einer

Proteingruppe mit Energie-metabolischen Eigenschaften von ca. 36% der Gesamt-Proteinanzahl dominierte (unter Therapie nur ca. 18%), unter Therapie dagegen die Aufregulation einer Proteingruppe mit zytoskelettalen Funktionen mit ca. 36% (vor Therapie 0%) erhöht war. Es stellt sich hier die Frage, ob diese veränderte Proteinkonstellation evtl. eine der Ursachen des durch die dauerhafte GA-Gabe herbeigeführten Phenotypshifts der TH-Zellen ist oder nur ein Zeichen einer verstärkten Proliferation darstellt, wie sie beispielsweise von Duda et al. beschrieben wurde (Duda et al. 2000). Auch wurde klar, dass sich die Proteinprofile von aktivierten gegenüber ruhenden T-Zellen einer Ag-Spezifität (in unserem Fall GA-spezifisch oder MBP-spezifisch) schon allein durch die (Ag-Zugabe bedingte) Zellaktivierung deutlich in ihrer Expression von einander unterscheiden. Damit konnte gezeigt werden, dass nur durch zuvor definierte Vergleiche (Tab. 3 und 8) und deren „Zusammenschau“ die gesuchten Ag-spezifischen Effekte auf die Proteinexpression von der allein durch die Stimulierung/Aktivierung der T-Zellen herbeigeführten Veränderung unterschieden werden kann.

Das es zu einer TH2-Phenotyp dominierten TH-Zell Verschiebung von GA-spezifischen TH-Zellen von MS-Patienten unter GA-Therapie kommt, konnte in Arbeiten von O. Neuhaus und D. Dabbert gezeigt werden (Neuhaus et al. 2000, Dabbert et al. 2000). Im Folgenden müssen die dargestellten Ergebnisse der Proteomics-Untersuchung jedoch in weiteren MS-Patienten reproduziert werden.

Die Proteomics-Methode eignet sich sehr gut, um aus einer fast unüberschaubaren Vielzahl von Proteinen, mit Hilfe z.B. der Quantitätsbestimmungen, die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, eine Anzahl möglicherweise relevanter Proteine zu finden. Die weitere Erforschung in Frage kommender Patho- bzw. Wirkungsmechanismen muss dann mit anderen Methoden erfolgen. Auch bietet sich an, ein „verdächtiges“, mittels Proteomics-Analyse identifiziertes Protein, mit besser reproduzierbaren und miteinander vergleichbaren Methoden, z.B. mit Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), zu quantifizieren.

Da die Betrachtung ganzer Proteinprofile und deren die Proteinfunktion betreffenden Untergruppierungen in unserer Analyse keine pathophysiologisch richtungsweisenden Unterschiede erbrachte, erschien es uns aussagekräftiger, die Betrachtung auf einzelne von uns identifizierte Proteine zu fokussieren. Hierzu zogen wir andere Proteom-Analyse Arbeiten von T- und B-Lymphozyten zur Bewertung unserer Protein-Einzelauswertung heran. Es wurden zusätzlich Informationen über bekannte Interaktionen der in Frage

kommenden einzelnen Proteine mittels einer ausführlichen Internet-Suche in Online-Bibliotheken, wie z.B. Pubmed, gewonnen. Dabei wurde auf Zusammenhänge mit Schlagwörtern wie z.B. T-Zellen, entzündliche Prozesse allgemein, autoimmune Prozesse/Erkrankungen, Zytokine, Zellproliferation etc. geachtet und zur Beurteilung des einzelnen Proteins herangezogen, um zu entscheiden, ob das jeweilige Protein evtl. eine Relevanz in Wirk- bzw. Pathomechanismen der MS besitzen könnte.

5.1 Analyse einzelner Proteine

5.1.1 Vergleich aktivierte GA-spezifische T-Zellen vor/unter Therapie

5.1.1.1 Prohibitin

Aus dem Vergleich der aktivierten GA-spezifischen T-Zellen des MS-Patienten vor/unter Therapie fiel uns *Prohibitin* (PHB) auf. PHB zeigte dabei eine erhöhte Expression in den T-Zellen unter Therapie. Im Vergleich „aktivierte vs ruhende GA-spezifische T-Zellen“ der gesunden Probanden konnte dagegen kein Expressionsunterschied des PHBs identifiziert werden. Dies spricht für die Annahme, dass die erhöhte Expression von PHB in T-Zellen durch die Behandlung des MS-Patienten mit GA und nicht durch die Induktion der Zellproliferation bedingt ist. Auch wiesen Rautajoki et al. in ihrer Arbeit aus dem Jahre 2004 (Rautajoki et al. 2004) nach, dass PHB vermehrt in T-Zellen mit dem Subtyp TH2 gegenüber TH1 exprimiert wird. TH2-Zellen wiederum werden durch die regelmäßige Behandlung (tägliche Injektion) mit GA induziert und exprimieren vermehrt antiinflammatorische Zytokine (Duda et al. 2000). Ob GA über eine Induktion der PHB-Expression den TH-Zell Shift von TH1 zu TH2 bewirkt oder ob die vermehrte Expression von PHB durch die GA spezifischen TH2-Zellen „nur“ ein spezifische Wirkung der GA Behandlung in den bereits vorhandenen TH2-Zellen darstellt, muß untersucht werden.

PHB konnte bisher in mehreren zellulären Strukturen lokalisiert werden. Dazu gehören Mitochondrien, Nucleus und in bestimmten Zelltypen auch die Plasmamembran. PHB besitzt eine Molekülmasse von ca. 30-32 kDa. Es gibt ein dem PHB sehr ähnliches Protein, das Prohibitin 2 (PHB 2) oder auch Prohibiton, mit einer Molekülmasse von ca. 37 kDa (Mishra et al. 2005). Die bisher am besten untersuchte Funktion des PHBs ist die als Chaperon-Protein in den Mitochondrien. Dabei formen PHB und PHB 2 einen in der

inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Komplex, der Proteine der mitochondrialen Atmungskette stabilisiert (Nijtmans et al. 2000). Desweiteren wird angenommen, dass PHB antiproliferative Eigenschaften als sogenanntes Tumor-Suppressor Protein besitzt (Wang et al. 1999). Allerdings fanden sich auch Hinweise auf eine anti-apoptotische Wirkung, zumindest bei Überexpression in zytotoxisch behandelten Osteosarkoma-Zellen (Fellenberg et al. 2003). In Zusammenhang mit der Lokalisation auf der Zelloberfläche wurde eine Assoziation des PHB/PHB 2-Komplexes mit dem IgM-Antigen Rezeptor auf B-Lymphozyten beschrieben. Weiter wird angenommen, dass PHB die Proliferation von Lymphozyten inhibiert, gleichzeitig jedoch zu einer Stimulation der Zelldifferenzierung führen kann (Terashima et al. 1994). Eine weitere Beobachtung identifiziert PHB als möglichen Membranrezeptor. In humanen, intestinalen Epithelzellen fungiert ein Komplex mit PHB und PHB 2 als Bindungsstelle für Salmonella typhi. Die Interaktion des PHB-Komplexes mit Salmonella typhi führt zur einer Induktion des Komplementsystems und Phagozytose (Sharma et al. 2004). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass membrangebundene PHB-Komplexe ein wichtiges Ziel für die Modulation durch inflammatorische Peptide sind. Immunhistochemisch konnte PHB des weiteren auch in der Gefäßwandstruktur von humanen, ausschließlich weißen, u.a. subkutanen Fettgewebe nachgewiesen werden. Die Menge an weißem Fettgewebe konnte dann durch Verbindung von pro-apoptotischen Peptiden mit dem PHB-Komplex reduziert werden (Kolonin et al. 2004). Dabei erscheint der Zusammenhang, dass Fettgewebe eine hohe Anzahl inflammatorischer Zellen besitzt (Trayhurn und Wood 2004), welche u.a. proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL 8 produzieren, mit den evtl. antiinflammatorischen und Fettgewebe-reduzierenden Eigenschaften des PHB, besonders erwähnenswert. Noch eine Interaktion des PHBs konnte identifiziert werden. Und zwar konnte durch Deletion von PHB der antiproliferative Effekt des Östrogen-Antagonisten 4-Hydroxy-Tamoxifen, welcher in der Brustkrebstherapie therapeutisch eingesetzt wird, inhibiert werden (Wang et al. 2004). Damit liegt die Vermutung nahe, dass PHB auch anti-Östrogene Eigenschaften besitzen könnte.

Alleine die beiden zuletzt erwähnten Aussagen, dass PHB antiproliferative Eigenschaften gegenüber mit inflammatorischen Zellen angereichertem Fettgewebe und gegenüber Östrogen-abhängigen Zellen besitzt, lassen schlussendlich für die Diskussion des PHB in unserem Versuch, folgende Fragen aufkommen. Spielen in der Pathogenese der MS PHB-Interaktionen mit u.a. dem weißen Fettgewebe und Östrogen-abhängigen Mechanismen eine Rolle? Können hier Hinweise gefunden werden, die erklären warum

MS häufiger bei Frauen auftritt und hier ja speziell bei jungen Frauen? Ist die GA-bedingte erhöhte Expression von PHB in T-Zellen beteiligt an dem Phenotyp-Shift der T-Zellen von proinflammatorisch zu antiinflammatorisch, der in mehreren Publikationen unter der GA-Behandlung gezeigt wurde (u.a. Neuhaus et al. 2000).

5.1.2 Vergleich aktivierter GA-spezifischer mit aktivierten MBP-spezifischen T-Zellen

Drei weitere Proteine fielen im Vergleich der aktivierten GA-spezifischen T-Zellen mit den aktivierten MBP-spezifischen T-Zellen auf.

5.1.2.1 Transgelin 2

Transgelin 2 zeigte eine erhöhte Expression in den GA-spezifischen T-Zellen. *Transgelin 2* ist ein Protein, von dem bisher angenommen wurde, dass es einzig in glatten Muskelzellen, viszeral und vaskulär, exprimiert wird. Es wird daher auch smooth muscle protein 22 beta (SSM22 β) genannt und besitzt ein Molekulargewicht von 22 kDa. In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit, wurden mittels Kombination aus 2D-Gelelektrophorese und Massenspektroskopie die Unterschiede in der Proteinexpression von B1- und B2-Zellen, generiert aus dem Peritoneum und der Milz von Mäusen, bestimmt. B1-Zellen, eine im peritonealen und pleuralem Raum dominierende Untergruppierung der B-Lymphozyten, unterscheiden sich u.a. hinsichtlich ihrer phenotypischen (CD5+) (Berland und Wortis 2002) und funktionalen Eigenschaften (IgM-Produktion ohne Interaktion mit T-Zellen) vom Großteil der B-Lymphozyten, auch B2-Zellen genannt (Herzenberg 2000). Dabei wurde überraschenderweise *Transgelin 2* in peritonealen B1-Zellen gefunden, nicht jedoch in den B1- und B2-Zellen in der Milz und dies mit einem deutlichen ca. 60-fachen Unterschied in der per Western Blot bestimmten Expression (Frances et al. 2006). Nach Stimulation der B2-Zellen konnte *Transgelin 2* dann auch in diesen Zellen nachgewiesen werden. Damit wurde das Protein *Transgelin 2* erstmals in Lymphozyten, in diesem Fall B-Lymphozyten, nachgewiesen. Die biologische Funktion von *Transgelin 2* bleibt bisher ungeklärt.

Wir konnten *Transgelin 2* auch in aktivierten/stimulierten T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut nachweisen. In den uns bekannten veröffentlichten Proteom-Analysen

von T-Lymphozyten wurde Transgelin 2 bislang nicht identifiziert bzw. sein Vorkommen wurde nicht beschrieben. Ob die Expression von Transgelin 2 in T-Lymphozyten abhängig ist von deren Ag-Spezifität, in unserem Fall sind dies die Antigene GA und MBP, bleibt im Rahmen von weiterführenden Untersuchungen zu klären. Dies gilt auch für die Beobachtung, dass neben der Expression von Transgelin 2 in GA- und MBP-spezifischen T-Zellen, die Expression von Transgelin 2 speziell in den GA-spezifischen T-Zellen zusätzlich aufreguliert ist. Somit könnte evtl. die durch GA erhöhte Expression von Transgelin 2 für den GA-induzierten Phenotyp-Shift der T-Zellen von TH1 zu TH2 mit verantwortlich sein. Interessant wäre auch herauszufinden, ob auch andere Auto-Ag spezifische T-Zellen (z.B. MOG, PLP, MAG, S100), welche bisher in der MS und EAE identifiziert werden konnten, Transgelin 2 exprimieren und ob es hier Unterschiede zu nicht mit Autoimmunprozessen in Verbindung stehenden Ag-spezifischen T-Zellen gibt.

5.1.2.2 Gelsolin

Gelsolin zeigte ebenfalls eine erhöhte Expression in den aktivierten GA-spezifischen im Vergleich zu MBP-spezifischen T-Zellen. Zusätzlich ist im Vergleich MBP+ vs. MBP- die Expression von Gelsolin in den aktivierten T-Zellen (MBP+) herunterreguliert. Gelsolin konnte bisher in zwei verschiedenen Formen identifiziert werden, einer zytoplasmatischen und einer sezernierten Plasma-Form mit einem Molekulargewicht von 90-95 kDa (Kwiatkowski et al. 1986). Neben der Eigenschaft als Aktin-modulierendes Protein, es reguliert u.a. die Länge der Aktinfilamente, besitzt Gelsolin noch die Fähigkeit eine Bindung zu Fibronectin, einem ebenfalls Aktin-modulierenden Protein, einzugehen (Lind und Janmey 1984). Es wird vermutet, dass die Verbindung von Gelsolin und Fibronectin dazu führt, dass Gelsolin so vermehrt in Regionen mit erhöhter Aktin-Zerstörung, wie sie z.B. in entzündetem Gewebe vorkommt, vordringen kann, um dort durch seine Aktin-modulierenden Eigenschaften Zell-stabilisierend/-reparativ zu wirken (Lind und Janmey 1984). Die beschriebene Fähigkeit des Gelsolins in Komplexbildung mit Fibronectin und unserem Ergebnis mit der erhöhten Expression in GA-spezifischen T-Zellen, werfen noch weitere Fragen auf: Sind die dem GA nachgesagten protektiven Effekte evtl. durch die erhöhte Gelsolin-Expression in T-Zellen bedingt? Ist Gelsolin somit vielleicht an Remyelinisierungsprozessen in MS-Läsionen beteiligt? Hinweise, dass Gelsolin in Wirkmechanismen des GA-bedingten TH1- zu TH2-Shift beteiligt sein könnte, konnten dagegen in der Literatur nicht gefunden werden.

5.1.2.3 Cyclophilin B

Cyclophilin B (CyPB), eine zelluläre Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase (PPIase) mit Cyclosporin-bindenden Eigenschaften, wurde mit einer erhöhten Expression in den aktivierten MBP-spezifischen T-Zellen identifiziert. CyPB ist in intrazellulären Kompartimenten wie z.B. dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisiert und wird in biologische Flüssigkeiten sezerniert. Neben der Eigenschaft als Cyclosporin-bindendes Protein zu wirken, interagiert CyPB speziell mit der Zellmembran von T-Lymphozyten. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass CyPB die Cyclosporin Wirkung und damit dessen Inhibition der CD3-induzierten Proliferation von T-Lymphozyten, steigert (Allain et al. 1996).

Es ist bekannt, dass CyPB mit zwei unterschiedlichen Arten von Bindungsstellen auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten des peripheren Blutes interagiert (Denys et al. 1998). In einem Vergleich von CyPB mit Cyclophilin A (CyPA) konnte weiter festgestellt werden, dass eine dieser Bindungsstellen, identifiziert als Interaktion zwischen Glykosaminoglykanen (GAGs) auf der T-Zelloberfläche und dem N-Terminus von Cyclophilinen, bevorzugt bei CyPB ausgebildet ist. Diese CyPB-spezifische Verbindung mit vorwiegend peripheren CD4⁺ T-Zellen (Denys et al. 1997) führt zu proinflammatorischen, chemokin-ähnlichen Interaktion mit einer gesteigerten/vermehrten Adhesion der CD4⁺ T-Zellen an die extrazelluläre Matrix (Allain et al. 2002). Diese ausgewiesenen proinflammatorischen Eigenschaften von CyPB fügen sich dabei sehr gut in die von uns gefundene Aufregulation von CyPB in peripheren, enzephalitogenen MBP-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Hinweise, die einen Zusammenhang von CyPB direkt mit Pathomechanismen der MS herstellen, fanden sich in der Literatur allerdings nicht, so dass auch hier weitere Untersuchungen nötig sind.

5.1.3 Vergleich aktivierte/ruhende GA-spezifische T-Zellen vor/unter Therapie und Vergleich aktivierte/ruhende MBP-spezifische T-Zellen

5.1.3.1 Peroxiredoxine

Die Peroxiredoxine (Prx) sind eine Proteingruppe mit bislang sechs bekannten Isoformen, bei der initial überwiegend antioxidative Eigenschaften nachgewiesen wurden. Ihre

Funktion wurde vor allem in der lebenswichtigen Reduktion von zellschädigenden Hydroperoxiden (H_2O_2) gesehen, welche im Rahmen des normalen Zellmetabolismus anfallen (Rhee et al. 2005). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die einst allein als zellzerstörerisch eingestuft Hydroperoxide zusätzlich an wichtigen Signalfunktionen beteiligt sind (Rhee 2006). Insbesondere die Interaktion mit Wachstumsfaktoren und hier speziell dem Platelet-derived growth factor (PDGF) führt bei vermehrter Produktion von H_2O_2 zu einer durch PDGF-Zunahme bewirkten Zellproliferation und -migration (Choi et al. 2005). Als negativen Regulator dieses Signalwegs konnte nun eine Isoform der Peroxiredoxine, das Peroxiredoxin II (Prx II) identifiziert werden, welches durch die H_2O_2 -Reduktion zu einer verminderten Expression von PDGF in der Zelle führt (Choi et al. 2005). Allerdings scheinen auch weitere Isoformen, u.a. Prx I, an Signalmechanismen von Wachstumsfaktoren beteiligt zu sein (Rhee et al. 2005). In der Literatur finden sich eine Vielzahl von Arbeiten, die PDGF und dessen Rezeptoren auf Oligodendrozyten im ZNS nachweisen konnten (Murtie et al. 2005, Wilson et al. 2006, Maeda et al. 2001). So fanden sich diese PDGF-Rezeptor positiven Oligodendrozyten auch vermehrt in MS-Läsionen (Maeda et al. 2001, Wilson et al. 2006). Man geht davon aus, dass die PDGF vermittelte Differenzierung und Proliferation der Oligodendrozyten u.a. neuroprotektive und remyelinisierende Prozesse zur Folge hat.

Wir fanden mehrere aufregulierte Isoformen der Peroxiredoxine in unserer Analyse:

Prx 3 in den aktivierten GA-spezifischen T-Zellen des MS Patienten vor Therapie (Tab. 7),

Prx 2 in den ruhenden GA-spezifischen T-Zellen des MS Patienten vor Therapie (Tab. 8)

Prx 1 in den aktivierten MBP-spezifischen T-Zellen der gesunden Probanden (Tab. 3).

Inwieweit die Aufregulation/erhöhte Expression dieser Pxr-Isoformen in den GA-spezifischen T-Zellen vor der GA Therapie und in den MBP-spezifischen T-Zellen Hinweise auf die oben beschriebene konsekutive Reduktion von PDGF und eine evtl. damit verbundene Störung von neuroprotektiven und remyelinisierenden Mechanismen gibt, ist in unserem Ansatz nicht abschließend zu klären. Es scheint jedoch weiter verfolgenswert, ob die dem GA nachgesagten neuroprotektiven bzw. remyelinisierenden Eigenschaften über Signalwege unter Einschluß von Prx, H_2O_2 und PDGF ablaufen.

5.2 Beurteilung und Stellung der Kombination aus 2D-Gelelektrophorese und Massenspektroskopie in der aktuellen Erforschung des Proteoms.

Die 2D-Elektrophorese ist momentan die einzige Technik, die in einem Ansatz parallel die quantitative Expressionsanalysen großer Mengen komplexer Proteinlysate erlaubt. Dabei können diese komplexen Proteingemische zusätzlich noch nach verschiedenen Kriterien differenziert werden, z.B. nach ihrem isoelektrischen Punkt, der Molekülmasse oder ihrer Löslichkeit. Auch können Veränderungen der Protein-Expression in Form von unterschiedlichen Isoformen oder posttranslationalen Modifikationen identifiziert werden. Zusätzlich lassen sich Mengen bis in den mg-Bereich einzelner Proteine isolieren, die dann für weitere Untersuchungen verwendet werden können. Abhängig von der Gelgröße und dem pH-Wert Bereich ist es somit möglich, mehr als 5000 Proteine simultan aufzutrennen und noch bis zu einer Menge von 1 ng Protein pro Spot zu quantifizieren. Dies und die Tatsache, dass aus den verschiedensten Geweben stammende, einfach (d. h. ohne großen Zeitaufwand und kostspielige Materialien) herzustellende Proteinlysate für eine umfassende Proteinanalyse ausreichen, machen die 2D-Elektrophorese aktuell und wahrscheinlich auch in überschaubarer Zukunft zu einer der meist angewandten Methoden.

Derzeit werden die Ergebnisse aus allen durchgeführten und noch geplanten Proteomanalysen aus den unterschiedlichsten Gewebe- bzw. Zellarten vieler verschiedener Organismen in Proteindatenbanken gesammelt. Unter www.expasy.org/ch2D/2dindex.html ("WORLD-2DPAGE Index to 2D PAGE databases") sind diese Daten zusammengefasst.

Ein weiteres wichtiges Ziel ist es einen generell anerkannten Standard in der Durchführung der Proteomics-Methodik zu entwickeln. Dies würde den Vergleich der Proteomanalysen untereinander deutlich valider und einfacher machen.

6. Zusammenfassung/Summary

6.1 Zusammenfassung

Die MS ist die häufigste chronisch-entzündliche demyelinisierende Erkrankung des jungen Erwachsenenalters und betrifft ausschließlich das ZNS. Neben den multifokalen, vorwiegend periventrikulär und perivaskulär gelegenen Entmarkungsprozessen, kommt es zusätzlich zu einer Axondegeneration. Histopathologisch findet sich hier meist eine perivaskuläre Ansammlung von T-Lymphozyten, Monozyten und Plasmazellen. Nach heutigem Wissen um die Immunpathologie der MS kommt autoreaktiven T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Induktion der initialen Entzündungsreaktion zu. Als Autoantigene werden u.a. Myelin basisches Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), Proteolipid Protein (PLP) und Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) angesehen. Die enzephalitogenen T-Zellen werden dominiert vom TH1-Zell Phänotyp mit einem vorwiegend proinflammatorischen Zytokinprofil (u.a. Interferon- γ , TNF- α , Interleukin-2).

Eine weit verbreitete, etablierte Therapie der schubförmig-remittierenden MS ist die Gabe von Glatiramerazetat (GA, Copaxone®). Dieses synthetische Copolymer besitzt nachgewiesene immunmodulatorische Eigenschaften und wird zur Schubprophylaxe eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass GA einen aktiven T-Zell Shift vom TH1- hin zum TH2-Subtyp bewirkt. In EAE-Versuchen wurde dabei die Fähigkeit aktivierter TH2-Zellen beobachtet, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und durch die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren protektiv auf Strukturen im ZNS zu wirken. Wie GA diesen Wechsel von proinflammatorisch zu antiinflammatorisch bewirkt, ob dies vielleicht durch eine Regulierung auf Proteinebene in den TH-Zellen, hier speziell den CD4+ TH-Zellen, zustande kommt und welche Proteine hier von Bedeutung sein könnten, ist zum Großteil weiterhin ungeklärt.

Unser Ziel war es, mittels der Methodenkombination SDS-PAGE und Massenspektroskopie, aus der Vielzahl der Proteine von GA- und MBP-spezifischen T-Zellen, einzelne Proteine zu identifizieren, welche eine spezifische Auf- bzw. Abregulierung durch die Behandlung mit GA erfahren haben und in Prozesse eingebunden sind, die mit der Regulation des Immunsystems assoziiert sind. Dazu wurden mit der Split-well Methode GA- und MBP-spezifische T-Zell Linien von drei

gesunden Probanden und einem MS-Patienten generiert und mittels ^3H -Thymidin-Test und FACS-Analyse auf ihre AG-Spezifität und ihren Subtyp geprüft. In der SDS-PAGE fand dann die Auftrennung und Bestimmung der Expression der einzelnen Proteine statt, welche anschließend mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektroskopie identifiziert wurden. Insgesamt konnten 120 unterschiedlich exprimierte Proteinspots dargestellt werden. Die Analyse mit Hilfe der Massenspektroskopie ergab 69 unterschiedliche Einzelproteine. In der Untersuchung gesunder Probanden waren beim Vergleich aktivierter (MBP+) vs. ruhender (MBP-) MBP-spezifischer T-Zellen 27 Proteine, im Vergleich aktivierter (GA+) vs. ruhender (GA-) T-Zell Linien 19 Proteine unterschiedlich reguliert. Eine unterschiedliche Expression zeigten 29 weitere Proteine im Vergleich aktivierter/ruhender MBP-spezifischer vs. GA-spezifischer T-Zell Linien. 22 Proteine konnten mit unterschiedlicher Expression bei einem MS-Patienten in aktivierten GA-spezifischen T-Zellen vor vs. unter GA-Therapie identifiziert werden – weitere 13 Proteine in nicht aktivierten T-Zellen vor vs. unter GA-Therapie. Zusätzlich wurde in diesem Vergleich eine deutliche, wahrscheinlich GA-bedingte Aufregulierung von Proteinen mit zytoskelettalen Funktionen gezeigt. Anhand eines Pathwayprogrammes konnten fünf Proteine ermittelt werden, die aufgrund ihres Ag-spezifischen Expressionsprofils und ihrer vorbeschriebenen Eigenschaften/Funktionen als potentielle Kandidaten für spezifische Wirk- bzw. Pathomechanismen der GA-Therapie oder der MS in Frage kommen. Namentlich sind dies Gelsolin, Transgelin 2, Prohibitin, Cyclophilin B und Peroxiredoxin 2. Die Arbeit zeigt, dass die Kombination aus 2D Gel-Elektrophorese und Massenspektroskopie geeignet ist, Unterschiede im Proteinprofil Ag-spezifischer T-Zell Linien aufzudecken, die in verschiedenen Krankheitsstadien etabliert wurden. Die Proteomics-Methode eignet sich sehr gut, um aus einer fast unüberschaubaren Vielzahl von Proteinen, mit Hilfe z.B. der Quantitätsbestimmung, die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, eine Anzahl möglicherweise relevanter Proteine zu finden.

Da die in diese Arbeit einfließenden Daten von einer geringen Probandenanzahl stammen, muss das Projekt insofern als Pilotstudie angesehen werden. Die gefundenen Proteine müssen mit weiteren Methoden wie PCR, Western Blot oder ELISA, welche eine geringere Zellanzahl benötigen, an weiteren GA- und MBP-spezifischen T-Zell Kulturen verifiziert werden.

6.2 Summary

Multiple Sclerosis (MS) is the most common chronic inflammatory neurological disorder in young adults, which leads to large focal lesions of demyelination and axonal damage in the central nervous system (CNS). Investigations in MS and the animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) indicate that autoreactive T cells play a pivotal role. Putative auto antigens include e.g. myelin basic protein (MBP), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), proteolipid protein (PLP) and myelin-associated glycoprotein (MAG). Initially the encephalitogenic T-cell response is dominated by the TH1 subtype which is characterized mainly by a proinflammatory cytokine profile (e.g. IFN- γ , TNF- α , IL-2).

One of the approved and most common therapies used in MS patients with relapsing-remitting MS is Glatiramer acetat (GA, Copaxone®). It is well known that this immunomodulatory “synthetic copolymer” induces a shift in the phenotype of peripheral CD4⁺ T cells, changing from TH1-type (pro-inflammatory T cells) to TH2-type (anti-inflammatory T cells). As demonstrated in EAE, activated TH2-type cells cross the blood-brain barrier and secrete beneficial molecules (e.g. cytokines and growth factors) reducing the CNS damage.

However, the molecular mechanisms involved in this effect have not been yet completely understood. Therefore, we were interested in the regulated proteom of GA- and MBP specific human T cell lines and to investigate whether this shift (TH1 to TH2) is a GA induced regulation on the protein level of TH-cells.

By investigating the protein profile of human GA and MBP specific CD4⁺ T cells with the combination of SDS-PAGE and massspectrometry we aimed to find single, Ag-specific expressed proteins that could be involved in regulatory processes of the immune system in MS. Using the “split well technique” we generated GA specific T cell lines from one MS-patient before and during therapy (six months after onset) with GA and GA and Myelin Basic Protein (MBP) specific T cell lines from three healthy donors in either activated or resting state. Only T cell lines that were identified by ³H-Thymidine-incorporation and FACS analysis as antigen-specific T cell lines with a phenotype of CD3⁺CD4⁺CD8⁻ were used. Proteom analysis was done using the combination of SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry, which enables us to identify the expression profile of many proteins at a time.

A total of 120 regulated protein spots were detected on the gels. Out of these 120 protein spots 69 different proteins were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. 27 proteins were differently expressed in the comparison of activated vs resting MBP specific T cells and 19 proteins in activated vs resting GA specific T cells in the healthy controls. A different expression of 29 additional proteins were found by comparing activated/resting MBP- vs. GA-specific T cell lines. In the MS-patient we found 22 proteins differently regulated in the activated and 13 proteins in the non activated GA specific T cell lines generated before and during therapy. In the comparison of activated cells a fraction of proteins with mainly cytoskeletal functions (36% vs 0%) was increased during therapy with GA.

In addition we performed a single protein pathway analysis which lead us to five proteins with important characteristics for further investigation. These are gelsolin, prohibitin, transgelin 2, cyclophilin B and peroxiredoxine 2. Based on their expression profile and their characteristics these five proteins may be involved in immunological mechanisms relevant in MS and/or possibly during GA treatment.

Our results indicate that proteomics are a valuable tool to detect differences in protein regulation among antigen specific T cells of different Ag-specificity as well as of T cells generated before and during GA therapy. The analysis of the expression profile of single proteins is a powerful technique to eliminate most of the unspecific proteins leaving only a manageable amount of proteins for further investigations.

Due to the low number of patients and controls the investigation shown here has to be considered as a pilot study. Replication of the selected proteins by other methods e.g. Western Blot or ELISA, which need a lower amount of T cells, in a larger number of GA and MBP specific T cell lines generated from MS patients is warranted.

7. Literaturverzeichnis

Abramsky O et al. (1977). Effect of a synthetic polypeptide (COP 1) on patients with multiple sclerosis and with acute disseminated encephalomyelitis. Preliminary report. *J Neurol Sci.* 31(3):433-438.

Achiron A and Miron S (2005). Intravenous immunoglobulin and multiple sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 29(3):247-54. Review.

Aharoni R et al. (1997). Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20):10821-6.

Allain F et al. (1996). Cyclophilin B mediates cyclosporin A incorporation in human blood T-lymphocytes through the specific binding of complexed drug to the cell surface. *Biochem J.* 15;317 (Pt 2):565-70.

Allain F et al. (2002). Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(5):2714-9. Epub 2002 Feb 26

Arnon R et al. (1996). New insights into the mechanism of action of copolymer 1 in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neurol.* 243(4 Suppl 1):S8-13. Review.

Babbe et al. (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192: 393-404.

Barnett et al. (2004). Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol.* 55(4):458-68.

- Becher B et al. (1999). Interferon-gamma secretion by peripheral blood T-cell subsets in multiple sclerosis: correlation with disease phase and interferon-beta therapy. *Ann Neurol.* 45(2):247-50.
- Beck RW et al. (1992). A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis. The Optic Neuritis Study Group. *N Engl J Med.* 326(9):581-8.
- Berger T et al. (1997). Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Lab Invest.* 76(3):355-64.
- Berland R und Wortis HH (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 253.
- Bornstein MB et al. (1982). Multiple sclerosis: trial of a synthetic polypeptide. *Ann Neurol.* 11(3):317-319.
- Bornstein MB et al. (1984). Clinical trials of copolymer I in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 436:366-372.
- Bornstein MB et al. (1991). A placebo-controlled, double-blind, randomized, two-center, pilot trial of Cop 1 in chronic progressive multiple sclerosis. *Neurology* 41(4):533-539.
- Bradshaw RA and Burlingame AL (2005). Critical Review-From proteins to proteomics. *IUBMB Life* 57(4-5):267-72.
- Brandt T, Dichgans J, Diener HC (2003). Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen. 4.Auflage, Kohlhammer Verlag.
- Brenner T et al. (2001). Humoral and cellular immune responses to Copolymer 1 in multiple sclerosis patients treated with Copaxone. *J Neuroimmunol.* 115(1-2):152-160.

- Brosnan CF et al. (1985). Immunogenic potentials of copolymer I in normal human lymphocytes. *Neurology* 35(12):1754-1759.
- Brück W et al. (2003). Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 206:181-185.
- Burns J et al. (1986). Human cellular immune response to copolymer I and myelin basic protein. *Neurology* 36(1):92-94.
- Charcot JM (1868). Histologie de la sclerose en plaques. *Gaz Hop* 41:554-555.
- Charcot JM (1877). Lecons sur les maladies du système nerveus faites à la Salpêtrière. Lectures on diseases of the nervous system. The New Sydenham Society, London
- Choi et al. (2005). Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* 435(7040):347-353.
- Comi G et al. (2001). European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging-measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Ann Neurol.* 49(3):290-297.
- Comi G (2006). Early treatment. *Neurol Sci.* 27 Suppl 1:S8-12.
- Compston A, Sadovnik AD (1992). Epidemiology and genetics of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 5(2):175-81.
- Cruveilhier J. (1842). Anatomie pathologique du corps humain. Paris : Bailliere.
- Dabbert D et al. (2000). Glatiramer acetate (copolymer-1)-specific, human T cell lines: cytokine profile and suppression of T cell lines reactive against myelin basic protein. *Neurosci Lett.* 289(3):205-8.

- Del Prete G (1998). The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol.* 16(3-4):427-55.
- Denny-Brown D, Brenner C (1944). Lesion in peripheral nerve resulting from compression by spring clip. *Archive of Neurology and Psychiatry* 52:1-19.
- Denys A et al. (1997). Distribution of cyclophilin B-binding sites in the subsets of human peripheral blood lymphocytes. *Immunology* 91(4):609-17
- Denys A et al. (1998). Involvement of two classes of binding sites in the interactions of cyclophilin B with peripheral blood T-lymphocytes. *Biochem J.* 15;336:689-97
- Dressel A et al. (2006) Glatiramer acetate-specific human CD8(+) T cells: increased IL-4 production in multiple sclerosis is reduced by glatiramer acetate treatment. *J Neuroimmunol.* 2006 Dec;181(1-2):133-40.
- Duda PW et al. (2000). Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 105(7):967-76.
- Farina C et al. (2001). Treatment of multiple sclerosis with Copaxone (COP): Elispot assay detects COP-induced interleukin-4 and interferon-gamma response in blood cells. *Brain* 124(Pt 4):705-719.
- Farina C et al. (2005). Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol.* 4(9):567-575. Review.
- Firth D. (1948). The case of Augustus d'Esté. Cambridge. Book Reviews
Alexander J (1950), *Hist Med Allied Sci.* V: 112-113.
- Fellenberg J et al. (2003). Identification of drug-regulated genes in osteosarcoma cells. *Int. J. Cancer* 105:636–643.

- Filippi M et al. (2006). Effects of oral glatiramer acetate on clinical and MRI-monitored disease activity in patients with relapsing multiple sclerosis: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Lancet Neurol.* 5(3):213-220.
- Frances R et al. (2006). B-1 cells express transgelin 2: Unexpected lymphocyte expression of a smooth muscle protein identified by proteomic analysis of peritoneal B-1 cells. *Molecular Immunology* 43:2124–2129.
- Frerichs FT (1849). Über Hirnsklerose. *Arch Ges Med* 10:334-337.
- Frick E (1976). Zur immunsuppressiven Behandlung der Multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 47:424-428.
- Fridkis-Hareli M et al. (1998). Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules. *J Immunol.* 160(9):4386-4397.
- Fridkis-Hareli M et al. (1999). Binding of random copolymers of three amino acids to class II MHC molecules. *Int Immunol.* 11(5):635-641.
- Görg A, Weiss W et al. (2004). Review: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4:3665–3685.
- Gonsette RE et al., (1987) Effects of immunosuppressive agents and particularly of cyclophosphamide on lymphocytes subsets in treated multiple sclerosis patients. *Riv Neurol.* 57(3):181-184.
- Grossman RI et al. (1986). Multiple sclerosis: gadolinium enhancement in MR imaging. *Radiology* 161:721-725.
- Hartung HP et al., MIMS-Study-Group (2002). Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 360(9350):2018-2025.

- Hein T und Hopfenmüller W (2000). Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt* 71:288 –294 ©Springer-Verlag 2000
- Herzenberg LA (2000). B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol. Rev.* 175, 9.
- Hussien Y et al. (2001). Glatiramer acetate and IFN-beta act on dendritic cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 121(1-2):102-110
- Jacobs L et al., (1981). Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. *Science* 214(4524):1026-1028.
- Janeway, *Immuno Biology*, 6th Edition 2005, A-22; 706-707, published by Garland Science Publishing
- Johnson KP et al. (1995). Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 45(7):1268-1276.
- Johnson KP et al. (1996). A review of the clinical efficacy profile of copolymer 1: new U.S. phase III trial data. *J Neurol.* 243(4 Suppl 1):S3-7. Review.
- Karandikar NJ et al. (2001). Glatiramer acetate (Copaxone) therapy induces CD8+ T cell responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 109:641-649.
- Kerschensteiner M et al. (1999). Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 189:865-870.
- Kidd D et al. (1999). Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain* 122:17-26.

- Kim HJ et al. (2004). Inflammatory potential and migratory capacities across human brain endothelial cells of distinct glatiramer acetate-reactive T cells generated in treated multiple sclerosis patients. *Clin Immunol.* 111(1):38-46.
- Kojima et al. (1994). Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia. *J Exp Med.* 180(3):817-829.
- Kolonin MG et al. (2004). Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat. Med.* 10:625–632.
- Kwiatkowski DJ et al. (1986). Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature* 323 (6087):455–8.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- Lassmann H et al. (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7:115-121.
- Lind SE, Janmey PA (1984). Human Plasma Gelsolin binds to Fibronectin. *J Biological Chemistry* 21:13262-13266.
- Lindert RB et al. (1999). Multiple sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Brain* 122:2089-2100.
- Ling PD et al. (1985). Antagonistic effect of interferon-beta on the interferon-gamma induced expression of Ia antigen in murine macrophages. *J Immunol.* 135(3):1857-63.
- Lucchinetti C et al. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-17.

- Maeda Y et al. (2001). Platelet-derived growth factor-alpha receptor-positive oligodendroglia are frequent in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 49(6):776-85
- Mc Donald WI et al. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50:121-127.
- Medaer R. (1979). Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? *Acta Neurologica Scandinavica* 60:189-192.
- Meinl E et al. (1993). Myelin basic protein-specific T lymphocyte repertoire in multiple sclerosis. Complexity of the response and dominance of nested epitopes due to recruitment of multiple T cell clones. *J Clin Invest* 92:2633-2643.
- Mertin J (1977). The evidence justifying immunosuppression therapy in multiple sclerosis. *Proc R Soc Med.* 70(12):871-874. Review.
- Milligan NM et al. (1987). A double-blind controlled trial of high dose Methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 50(5):511-6.
- Multiple Sklerose-Therapie-Konsensus Gruppe, MSTKG (2001). Escalating immunomodulatory therapy of multiple sclerosis. 1st supplement: December 2000. *Nervenarzt* 72(2):150-7.
- MSTKG (2004). Escalating immunotherapy of multiple sclerosis--new aspects and practical application. *J Neurol.* 251(11):1329-39.
- Murtie JC et al. (2005). PDGF and FGF2 pathways regulate distinct oligodendrocyte lineage responses in experimental demyelination with spontaneous remyelination. *Neurobiol Dis.* 19(1-2):171-182

- Neuhaus O et al. (2000). Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(13):7452-7457.
- Neuhaus O et al. (2001). Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. Neurology 56(6):702-8.
- Nijtmans LG et al. (2000). Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. EMBO J. 19:2444–2451.
- Noronha et al. (1993). Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 46(1-2):145-53.
- Noseworthy JH et al. (2000). Review Multiple Sclerosis. N Eng J Med 343(13):938-52.
- Nyman TA et al. (2001). A proteome database of human primary T helper cells. Electrophoresis 22:4375–4382.
- Pearce J.M.S (2005). Historical Descriptions of Multiple Sclerosis. Eur Neurol 54:49-53.
- Pette M et al. (1990). Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. Neurology 40(11):1770-1776.
- Polman CH et al. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". Ann Neurol. 58(6):840-6
- Poser CM et al. (1965). Clinical Diagnostic Criteria in epidemiological Studies of Multiple Sclerosis. Ann N Y Acad Sci. 122:506-519.
- Poser CM et al. (1983). New diagnostic criteria for multiple sclerosis : guidelines for research protocols. Ann Neurol. 13(3):227-31.

Poser S, Bauersfeld T (1995). The changing diagnostic pattern of multiple sclerosis in an epidemiological area. *J Neuroimmunol [Suppl1]*:72

Prat A et al. (2005). Th1 and Th2 lymphocyte migration across the human BBB is specifically regulated by interferon beta and copolymer-1. *J Autoimmun.* 24(2):119-24.

Ragheb S et al. (2000). Long-term therapy with glatiramer acetate in multiple sclerosis: effect on T-cells. *Mult Scler.* 7(1):43-47.

Rautajoki K et al. (2004). Proteome characterization of human T helper 1 and 2 cells. *Proteomics* 4:84–92.

Rhee SG et al. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 38(12):1543-52.

Rhee SG et al. (2005). Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol.* 17(2):183-9.

Rhee SG (2006). Cell Signaling: H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science* 30;312(5782):1882-3.

Rindfleisch E (1863). Histologisches Detail zu der grauen Degeneration von Gehirn und Rückenmark. Zugleich ein Beitrag von der Entstehung und Verwandlung der Zelle. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 26:474-483.

Rivers TM, Schwentker FF (1935). Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *Exper Med* 61:689-702.

Rudick et al. (1997). Management of multiple sclerosis. *N Eng J Med.* 337(22):1604-11.

- Sadovnik AD et al. (1999). Genetic counselling in multiple sclerosis : risks to sibs and children of affected individuals. *Clin Genet* 56:118-122.
- Sadovnik AD (1993). Review: Familial recurrence risks and inheritance of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 6(2):189-94.
- Schumacher GA et al. (1965). Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in Multiple Sclerosis. *Ann NY Sci* 122:552-568.
- Scotet E et al. (1999). Frequent enrichment for CD8 T cells reactive against common herpes viruses in chronic inflammatory lesions: towards a reassessment of the physiopathological significance of T cell clonal expansions found in autoimmune inflammatory processes. *Eur J Immunol* 29: 973-985
- Sharma A, Qadri A (2004). Vi polysaccharide of Salmonella typhi targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:17492–17497.
- Silberberg et al. (1973). Multiple sclerosis unaffected by azathioprine in pilot study. *Arch Neurol* 28:210-212.
- Sorensen PS (2003). Treatment of multiple sclerosis with intravenous immunoglobulin: review of clinical trials. *Neurol Sci.* 24 Suppl 4:S227-30.
- Suresh Mishra et al. (2005). Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *TRENDS Molecular Medicine* Vol.11 No.4.
- Teitelbaum D et al. (1971). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol.* 1(4):242-248.
- Teitelbaum D et al. (1972). Protection against experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* 1972 Dec 29;240(5383):564-566.

- Teitelbaum D et al. (1997). Copolymer 1 from the laboratory to FDA. *Isr J Med Sci.* 33(4):280-284. Review.
- Tennakoon DK et al. (2006). Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol.* 176(11):7119-29
- Terashima M et al. (1994). The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein. *EMBO J.* 13:3782–3792.
- Thompson et al. (1997). Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 120 (Pt 6):1085-96.
- Trapp BD et al. (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New Engl J Med* 338 :278-285.
- Trayhurn P, Wood IS (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 92:347–355.
- Trotter JI, Garvey WF (1980). Prolonged effects of large-dose methyl-prednisolone infusions in multiple sclerosis. *Neurology* 30:702-708.
- Vargas-Leal V et al. (2005). Expression and function of glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and their receptors on human immune cells. *J Immunology* 175:2301-2308.
- Wang S et al. (1999). Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene* 18:3501–3510.
- Wang S et al. (2004). BRG1/BRM and prohibitin are required for growth suppression by estrogen antagonists. *EMBO J.* 23:2293–2303.
- Weber F (2002). Effects of autoreactive T cells and cytokines in the pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Int. MS Journal* 9:29-35

Weber MS et al. (2004). Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. *Brain*. 127(Pt 6):1370-8.

Weinshenker BG et al. (1989a). The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112 (Pt 1):133-46.

Wekerle H et al. (1986). Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 9:271-276.

Wekerle H (2005). Immune pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurol Sci*. 26 Suppl 1:S1-2.

Wilson HC et al. (2006). Co-expression of PDGF alpha receptor and NG2 by oligodendrocyte precursors in human CNS and multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol*. 176(1-2):162-73

Wucherpfennig KW et al. (1995). Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules: a mechanism for MHC-linked susceptibility to human autoimmune diseases. *J Exp Med*. 181(5):1597-1601.

Young IR et al. (1981). Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *The Lancet* :1063-1066.

Ziemssen T et al. (2002). Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. Brain-derived neurotrophic factor. *Brain* 125(Pt 11):2381-2391.

8. Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. F. Weber für die Betreuung und stete Unterstützung meiner Arbeit.

Vielmals danken möchte ich auch Frau A. Jacobs und Herrn Prof. C. Turck, für die Durchführung und Auswertung der Massenspektroskopie.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Vivian Vargas-Leal und Herrn Joachim Hornung für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. F. Holsboer für die Möglichkeit wissenschaftliche Arbeit und klinische Ausbildung miteinander zu verbinden.

9. Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Matthias Jeffrey Knop
Geburtsdatum	02.10.1973
Geburtsort	Adelaide
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

1980-1984	Thomas-Morus Grundschule in Münster
1984-1989	Pascal-Gymnasium in Münster
1989-1990	Gymnasium an der Stadtmauer in Bad Kreuznach
1990-1991	Scotch College in Adelaide, Südastralien
1991-1993	Gymnasium an der Stadtmauer in Bad Kreuznach Abitur 1993
1993-1995	Zivildienst beim Deutsches Roten Kreuz in Münster
1995-1996	Studium der Marinen Umweltwissenschaften an der Carl von Ossietzky-Universität in Oldenburg
1996-2003	Medizinstudium an der LMU München, Physikum 1999 1. Staatsexamen 2000 2. Staatsexamen 2002 3. Staatsexamen Juni 2003

Praktisches Jahr

- | | |
|------------|---|
| 1. Tertial | Neurologie im Universitätsklinikum Großhadern der LMU unter Prof. T. Brandt |
| 2. Tertial | Innere Medizin in der Poliklinik der LMU München unter Prof. Bogner |
| 3. Tertial | Chirurgie im Conradie Hospital der University of Cape Town |

Berufliche Tätigkeit

- | | |
|----------------------|---|
| Seit 10/2003 | am Max Planck Institut für Psychiatrie in München unter Prof. Dr. Dr. F. Holsboer |
| bis 10/2004 | Arzt im Praktikum auf der neurologischen Station |
| bis 11/2005 | psychiatrische Station |
| seit 11/2005 | neurologische Ambulanz |
| parallel bis 10/2006 | Stipendium als Doktorand in der AG „Entzündliche ZNS-Erkrankungen“ bei Prof. Dr. F. Weber |

München, den 02. April 2007

10. Erklärung an Eides Statt

Ich erkläre, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.