

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) –
Untersuchungen zur Expression und Regulation *in vitro*
sowie zur funktionellen Relevanz in der experimentellen
autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Seray Demir, geb. Cetin
aus Rotenburg a.d. Fulda

Göttingen 2010

Referent: Herr Prof. Dr. E. Wimmer

Korreferent: Herr Prof. Dr. D. Doenecke

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2010

für Kemal Hilmi

1.	Einleitung	7
1.1	Neurotrophine	7
1.2	Neurotrophine im Immunsystem	8
1.3	Neurotrophe Zytokine	11
1.4	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> (BDNF)	12
1.5	Die Multiple Sklerose (MS) und das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)	16
1.6	Neuroprotektive Autoimmunität	20
1.7	Zielsetzung	22
2.	Materialien	23
2.1	Geräte	23
2.2	Labormaterialien	24
2.3	Chemikalien	25
2.4	Lösungen und Puffer	
2.5	Medien und Medienzusätze	28
2.5.1	Medienzusätze	28
2.5.2	Medien	28
2.6	Enzyme, Farbstoffe, Neurotrophine, Seren, Zellstimulanzen	29
2.7	Kits	29
2.8	Antikörper	29
2.9	Komponenten der Immunisierung	30
2.10	Tiere	30
2.11	Komponenten der Real-Time PCR	30
2.12	Primer Proben für die Real-Time PCR	31
2.13	Bakterienstamm	31
2.14	Plasmide	31
2.15	Restriktionsenzyme	32
2.16	Längenstandards	32
2.17	Radioaktivität	32
2.18	Software	32

3. Methoden	33
3.1 Molekularbiologische Methoden	33
3.1.1 Isolation von RNA	33
3.1.2 Umschreiben von mRNA in cDNA	33
3.1.3 Quantifizierung von mRNA-Transkripten mittels Real-Time PCR	34
3.1.4 Klonierung / Ligation / Transformation	38
3.1.5 Plasmidaufreinigung	39
3.1.6 Restriktionsverdau	39
3.1.7 DNA-Agarose Gelelektrophorese	40
3.1.8 BDNF-ELISA	40
3.2 Zellbiologische Methoden	42
3.2.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus primären und sekundären lymphatischen Organen	42
3.2.2 Restimulation von T-Zellen aus einer Zelllinie	42
3.2.3 Aufreinigung von Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation	43
3.2.4 Astrozyten- / Mikrogliapräparation	43
3.2.5 Isolation von mononukleären Leukozyten aus dem Rückenmark	44
3.2.6 Magnetische Zellsortierung (MACS)	45
3.2.7 Aufreinigung von T-Zellen	45
3.2.8 Zellstimulationen	46
3.2.9 Bestimmung der Zellzahl	46
3.2.10 Durchflusszytometrie	47
3.2.10.1 Extrazelluläre Färbungen	47
3.2.11 Transfektion	48
3.2.12 Proliferationsassay	49
3.2.13 Überlebensassay mit murinen Dorsalwurzelganglien Zellen	49
3.2.14 Herstellung lentiviraler Partikel	50
3.2.15 Lentivirale Transduktion	51
3.3 Tierexperimentelle Methoden	51
3.3.1 Tiere	51
3.3.2 Induktion und klinische Evaluation einer aktiven MOG ₃₅₋₅₅ -EAE	52
3.3.3 <i>intra venöse</i> (i.v.) Injektion	52
3.4 Histologie und Immunzytochemie	53
3.4.1 CD3 / Mac-3 / GFP Färbung	53

3.4.2	iNOS Färbung	54
3.4.3	Anti-BDNF Färbung von Mäuse – Cytospins	55
3.4.4	Silberimprägnation nach Bielschowsky	56
3.4.5	pTrkB Fluoreszenzfärbung	57
4.	Ergebnisse	58
4.1	BDNF Expression und Regulation <i>in vitro</i>	58
4.1.1	Expression und Quantifizierung der mBDNF mRNA <i>Splice</i> -Varianten im Gehirn	58
4.1.2	Expression und Quantifizierung der mBDNF mRNA <i>Splice</i> -Varianten in peripheren lymphatischen Organen und Immunzellen	60
4.1.3	Expression und Quantifizierung der mBDNF mRNA <i>Splice</i> -Varianten in Mikroglia und Astrozyten	64
4.2	BDNF und dessen funktionelle Relevanz in der EAE	67
4.2.1	Generierung BDNF überexprimierender T-Zellen mittels lentiviraler Transduktion	68
4.2.2	Testen des codierenden BDNF Proteins auf Bioaktivität	73
4.2.3	Testen der Überlebensrate i.v. injizierter T-Zellen <i>in vivo</i>	75
4.2.4	Prüfung des Eintritts injizierter T-Zellen in das ZNS	76
4.2.5	Einfluss der BDNF überexprimierenden T-Zellen auf die MOG ₃₅₋₅₅ -EAE	78
4.2.6	iNOS Expression	82
4.2.7	pTrkB Expression	83
4.2.8	Aktivierungsstatus i.v. injizierter T-Zellen <i>in vivo</i>	85
5.	Diskussion	89
5.1	BDNF Expression und Regulation <i>in vitro</i> – <i>Splice</i>-Varianten	89
5.2	BDNF und dessen funktionelle Relevanz in der MOG₃₅₋₅₅-EAE	92
6.	Zusammenfassung	108
7.	Literaturverzeichnis	110
8.	Anhang	125
8.1	Abkürzungsverzeichnis	125
8.2	Abbildungsverzeichnis	129
8.3	Danksagung	131
8.4	Eidesstattliche Erklärung	132
8.5	Lebenslauf	133

1. Einleitung

1.1 Neurotrophine

Neurotrophine sind eine Familie von Polypeptiden, die ihre Funktion zwar überwiegend, aber nicht ausschließlich im Nervensystem ausüben. Sie wurden ursprünglich als Überlebensfaktoren für neuronale Zellen beschrieben (Oppenheim et al., 1991; Purves et al., 1988). Im zentralen Nervensystem (ZNS) regulieren Neurotrophine wichtige Funktionen wie die neuronale Differenzierung und neuronales Überleben, Neuriten-Wachstum und Plastizität, synaptische Struktur und Verbindungen, sowie Neurotransmittersekretion und synaptische Plastizität (Huang and Reichardt, 2001). Zahlreiche spätere Arbeiten zeigen neben den genau untersuchten Effekten der Neurotrophine auf Neuronen auch ein weit gefächertes Wirkungsfeld von Neurotrophinen außerhalb des Nervensystems, vor allem auf Zellen des Immunsystems (Sariola, 2001; Tessarollo, 1998; Vega et al., 2003).

Das 1952 zuerst entdeckte Neurotrophin ist der Nervenwachstumsfaktor (*Nerve growth factor*) NGF (Levi-Montalcini, 1952), daneben gehören zu dieser Familie noch das in dieser Arbeit untersuchte *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF) (Barde et al., 1982), das Neurotrophin-3 (NT-3) (Maisonpierre et al., 1991) und das Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) (Ip et al., 1992). Außerdem wurden noch zwei weitere weniger untersuchte Neurotrophine, das Neurotrophin-6 und Neurotrophin-7, beschrieben. Diese konnten aber bislang nur bei Fischen nachgewiesen werden (Gotz et al., 1994; Nilsson et al., 1998).

Alle Neurotrophine werden zunächst als glykosylierte Neurotrophin-Vorläufer exprimiert (Pro-Neurotrophin, 31-35 kDa), die durch spezielle Konvertasen an hochkonservierten Schnittstellen in reife Neurotrophine (13.2-15.9 kDa) gespalten werden (Chao and Bothwell, 2002). Diese reifen Neurotrophine bilden dann stabile nicht-kovalent gebundene Homodimere (Wiesmann and de Vos, 2001).

Neurotrophine können an zwei verschiedene Typen von Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität binden. Der niedrig affine Rezeptor p75^{NTR} gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie und dient als pan-Neurotrophin-Rezeptor (Caroleo et al., 2001; Hempstead, 2002). Die funktionelle Rolle von p75^{NTR} ist noch nicht ganz aufgeklärt (Lee et al., 2001), aber es wird vermutet, dass dieser Rezeptor als Co-Rezeptor für die hochaffinen Rezeptoren (Esposito et al., 2001; Roux and Barker, 2002) und als Mediator des Apoptoseprogramms dient, welches durch NGF induziert wird (Chao and

Bothwell, 2002; Meldolesi et al., 2000; Miller and Kaplan, 2001). Darüber hinaus vermittelt der p75^{NTR} Rezeptor die Migration von Schwann Zellen (Bentley and Lee, 2000) und ist an der Entscheidung über das Zellschicksal einiger nicht-neuronaler Zellen, wie den Makrophagen (Caroleo et al., 2001) und den glatten Gefäßmuskelzellen (Wang et al., 2000) beteiligt. Die Protein Tyrosin Kinase (Trk) Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC stellen die spezifischen und hochaffinen Neurotrophin Rezeptoren dar (Huang and Reichardt, 2001; Lewin and Barde, 1996). Diese Trk Rezeptoren besitzen eine extrazelluläre Domäne, an die die unterschiedlichen Neurotrophine binden, und eine zytosolische Domäne, dessen Tyrosinkinase Aktivität essenziell für die Signaltransduktion ist. Jedes Mitglied der Trk Familie besitzt einen bevorzugten Liganden unter den Neurotrophinen (Ip and Yancopoulos, 1994). An den TrkA Rezeptor bindet bevorzugt das NGF (Kaplan et al., 1991; Klein et al., 1991a), aber auch NT-3 und NT4/5 können an diesen Rezeptor, jedoch mit geringerer Affinität, binden. TrkB ist der spezifische Rezeptor für BDNF und NT-4 und in geringerem Maße auch für NT-3 (Ip et al., 1992; Klein et al., 1991b), während TrkC nur einen Liganden hat, und zwar das NT-3 (Lamballe et al., 1991). Die Gene, die für die Trk Rezeptoren codieren stammen vermutlich aus einem gemeinsamen Ursprungsgen (Hallbook, 1999), da alle Trk Rezeptoren in allen Wirbeltieren vorhanden und ihre Sequenz hochkonserviert ist.

1.2 Neurotrophine im Immunsystem

Neurotrophine sind hauptsächlich im ZNS vorzufinden, jedoch wurden sie und ihre Rezeptoren auch in primären und sekundären lymphatischen Organen, sowie Immunzellen detektiert (Aloe et al., 1999), wodurch diese potenzielle Ziele von Neurotrophinen darstellen. Interessanterweise konnten in allen untersuchten Wirbeltieren, von Mensch bis zum Fisch, Neurotrophine und bzw. oder deren Rezeptoren in lymphoiden Organen detektiert werden (Ciriaco et al., 1996; Hannestad et al., 1997; Hannestad et al., 2000). Im Thymus beispielsweise konnte die mRNA aller Neurotrophine und deren Rezeptoren nachgewiesen werden (Labouyrie et al., 1997; Laurenzi et al., 1994; Timmusk et al., 1993). In Säugertieren wurde der TrkA Rezeptor hauptsächlich in subkapsulären und medullären Epithelzellen lokalisiert (Garcia-Suarez et al., 2001; Hannestad et al., 1997; Parrens et al., 1999; Yoon et al., 2003), während die Expression in Thymozyten nicht detektiert werden konnte (Hannestad et al., 1997; Maroder et al., 1996; Parrens et al., 1999). Die Hauptfunktion des thymischen TrkA Rezeptors scheint die Regulierung des NGF Neurotrophins zu sein, welches zu einer

epithelialen Zellhypertrophie *in vivo* führt (Abramchik et al., 1988) und die IL-6 Transkription in den Epithelzellen *in vitro* erhöht (Screpanti et al., 1992). Die Expression der mRNA des *full-length* (Laurenzi et al., 1994; Maroder et al., 1996) sowie der verkürzten, *truncated*, (Lomen-Hoerth and Shooter, 1995) Isoform des TrkB Rezeptors im Thymus konnte in beiden Fällen nachgewiesen werden. Auf Proteinebene konnte die Expression des TrkB Rezeptors in Thymozyten (Besser and Wank, 1999; Maroder et al., 1996), sowie in den Stromazellen detektiert und dort als ED1+ bzw. F4/80+ Makrophagen in der Ratte und der Maus (Garcia-Suarez et al., 2002) identifiziert werden. Der TrkC Rezeptor hingegen konnte bislang nicht im Thymus von Säugetieren detektiert werden, während die mRNA des p75 Neurotrophinrezeptors dort lokalisiert wurde, und zwar hauptsächlich im Stroma (Lomen-Hoerth and Shooter, 1995), in den medullären Epithelzellen und den dendritischen Zellen (Garcia-Suarez et al., 2001; Parrens et al., 1999). Im Fall der Neurotrophine, konnte das NGF z.B. im Thymus, hauptsächlich in der Medulla, nachgewiesen werden, wo es womöglich auch lokal vor Ort synthetisiert wird (Aloe and Tuveri, 1997; Katoh-Semba et al., 1993; Turrini et al., 2001). Da man bereits weiß, dass auch T-Zellen NGF produzieren (Ehrhard et al., 1993; Lambiase et al., 1997; Santambrogio et al., 1994), könnte man davon ausgehen, dass dieses Neurotrophin auf parakrine Art und Weise seine Funktion auf die TrkA exprimierenden Epithelzellen ausübt. Die mRNA für das Neurotrophin BDNF hingegen wurde im Thymus detektiert, wo es von Stromazellen exprimiert wurde (Laurenzi et al., 1994; Timmusk et al., 1999; Yamamoto et al., 1996), außerdem scheint dieses Neurotrophin durch die Bindung an seinen spezifischen TrkB Rezeptor, welches auf unreifen Thymozyten exprimiert wird, für das Überleben der Thymozyten in bestimmten Entwicklungsstadien notwendig zu sein (Maroder et al., 1996). Im Thymus konnten außerdem die Neurotrophine NT-3 (Katoh-Semba et al., 1996; Laurenzi et al., 1994) und NT-4/5 (Laurenzi et al., 1994; Timmusk et al., 1993) auf mRNA und auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die zelluläre Quelle dieser Neurotrophine, sowie ihre Rolle im Thymus sind bisher nicht aufgeklärt.

In der Milz konnten alle Neurotrophine (Laurenzi et al., 1994; Timmusk et al., 1993; Yamamoto et al., 1996), sowie die Neurotrophinrezeptoren p75 und die spezifischeren Trk Rezeptoren detektiert werden (Laurenzi et al., 1994; Yamamoto et al., 1996). In der Milz der Ratte wurde die p75^{NTR} Expression in den dendritischen Zellen im PALS (periarterielle lymphatische Scheiden) detektiert (Perez-Perez et al., 2003), während die TrkA Expression bislang nicht detektiert werden konnte. Der TrkB Rezeptor hingegen wurden mit Hilfe der Immunhistochemie in Subpopulationen von Makrophagen des Menschen (Shibayama and Koizumi, 1996), der Ratte und der Maus (Perez-Perez et al., 1999) identifiziert.

Dass Neurotrophine auch einen Einfluss auf Lymphozyten haben, wurde erstmals durch Dean et al. (1987) berichtet. Dieser beobachtete, dass NGF die blastogene Antwort der Milzzellen der Maus erhöhte. Die Expression von Neurotrophinen und deren Rezeptoren auf Lymphozyten ist teilweise abhängig von ihrer Zellaktivierung (Kerschensteiner et al., 1999; Moalem et al., 2000). Die Expression von NGF und seinem spezifischen Rezeptor TrkA wird durch die Mitogenaktivierung der CD4⁺ T-Zellen induziert (Ehrhard et al., 1993), und der TrkA Rezeptor scheint deswegen funktionell zu sein, da die NGF Wirkung auf Antigen stimulierte CD4⁺ T Zellen die Expression von c-fos, einem Transkriptionsfaktor, induziert (Ehrhard et al., 1994). Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen produzieren NGF, welches nach Antigenstimulation in der Th2 Untergruppe erhöht wird (Santambrogio et al., 1994). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass unstimulierte humane CD4⁺ Th1 und Th2 Zellen, aber nicht die Th0 Zellen, NGF und TrkA exprimieren (Lambiase et al., 1997). Th1 Zellen exprimieren zusätzlich das *full-length* TrkB und geringe Mengen des TrkC Rezeptors (Besser and Wank, 1999). CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen transkribieren sowohl BDNF mRNA und produzieren bioaktives BDNF (Braun et al., 1999; Kerschensteiner et al., 1999; Kruse et al., 2007) als auch NT-3 und NT-4/5 (Moalem et al., 2000). Im Gegensatz dazu ist die Expression von p75^{NTR} in T-Zellen kontrovers (Ehrhard et al., 1993; Kittur et al., 1992).

In B-Zellen wurde die Expression von TrkA (D'Onofrio et al., 2000; Torcia et al., 1996) und p75^{NTR} (Brodie et al., 1996) beobachtet. Schenone et al. (1996) jedoch berichteten, dass B-Zellen weder auf mRNA noch auf Proteinebene p75^{NTR} oder TrkA exprimieren. Dafür beobachteten diese Autoren, dass B-Zellen TrkB auf mRNA und Proteinebene exprimieren und dass dieser Rezeptor durch das Neurotrophin BDNF aktiviert wird. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Ergebnissen könnten auf den Aktivierungsstatus der Zellen zurückzuführen sein. Die Expression von TrkB auf B-Zellen konnte durch eine weitere Arbeitsgruppe bestätigt werden (D'Onofrio et al., 2000), und eine mögliche Expression des TrkC Rezeptors auf B-Zellen wurde angedeutet (D'Onofrio et al., 2000). Im Fall der Neurotrophinexpression wurde in B-Zellen die Expression von NGF (Santambrogio et al., 1994; Torcia et al., 1996) und NT-3 (Besser and Wank, 1999) beobachtet. Interessanterweise scheint NGF auch im Überleben der B-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen, da es in der Lage ist diese Zellen von der induzierten Apoptose zu schützen (Kronfeld et al., 2002).

Im Fall der Monozyten wurde beobachtet, dass diese den TrkA Rezeptor exprimieren, und dass die Expression nach Aktivierung erhöht ist, aber während der Differenzierung zu den Gewebemakrophagen herunterreguliert wird (Ehrhard et al., 1993a). Was die Neurotrophine betrifft konnte die Expression von NGF, BDNF und NT4/5 in den Makrophagen detektiert

werden (Braun et al., 1999; Caroleo et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass NGF und BDNF sowohl das Zytokinexpressionsmuster in mononukleären Zellen des peripheren Bluts beeinflussen als auch in antigenspezifischen T-Zellen die Produktion von IL-4, TGF- β , TNF- α und INF- γ modulieren (Bayas et al., 2003).

Zusammengefasst scheinen die Neurotrophin/Rezeptor Systeme eine wichtige Rolle in der T- und B-Zellphysiologie zu spielen. Des Weiteren scheint jede Lymphozyten Untergruppe ihr ganz eigenes charakteristisches Muster an Neurotrophinen und deren spezifischen Rezeptoren zu exprimieren.

1.3 Neurotrophe Zytokine

Eine andere Familie von Wachstumsfaktoren ist die Familie der neurotrophen Zytokine. Sie umfasst die Moleküle, die ursprünglich als Zytokine identifiziert wurden, die von Lymphozyten freigesetzt werden und die Proliferation fördern, wozu auch das Interleukin-6 zählt (IL-6). Diese Moleküle wirken auch auf das neuronale Überleben und deren Differenzierung, in diesem Zusammenhang wurde das neurotrophe Zytokin *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) identifiziert. Diese Wachstumsfaktoren üben ihre biologischen Effekte über einen Rezeptorkomplex aus, der aus einer ubiquitär exprimierten gp130 und zytokinspezifischen Untereinheiten, wie z.B. CNTF-Rezeptor- α oder LIF Rezeptor β , besteht. Die Aktivierung des Rezeptorkomplexes ist in der Lage eine intrazelluläre Kaskade an Proteinkinasen, wie der JAK und MAP Kinase, zu aktivieren. Diese Kinasen wiederum kontrollieren die Aktivität der Transkriptionsfaktoren, die der STAT Familie angehören (Bravo and Heath, 2000).

Das neurotrophe Zytokin CNTF scheint offensichtlich einen Einfluss auf die autoimmune Demyelinisierung auszuüben und wird im Folgenden näher erläutert. CNTF ist ein 25 kDa Polypeptid und wurde ursprünglich als Überlebensfaktor für ziliäre Ganglienneurone identifiziert (Adler et al., 1979). Dem CNTF fehlt eine hydrophobe Sekretionssequenz, wodurch es im Zytoplasma lokalisiert ist und da es nur nach einem Gewebeschaden freigesetzt wird auch als Läsionsfaktor betrachtet wird (Sleeman et al., 2000; Stockli et al., 1989). Die Expression des CNTF ist in der Peripherie auf Schwannzellen und im zentralen Nervensystem auf Astrozyten begrenzt. Der CNTF Rezeptor hingegen konnte hauptsächlich in neuralem Gewebe und dem Skelletmuskel detektiert werden, zeigte aber auch eine geringe Expression in der Nebenniere, Haut, Leber, Nieren und Hoden (Oppenheim et al., 1991;

Sleeman et al., 2000; Stockli et al., 1991). CNTF ist *in vitro* ein wirksamer Überlebens- und Differenzierungsfaktor für viele Zelltypen des Nervensystems, wie Neuronen und Oligodendrozyten (Adler et al., 1979; Arakawa et al., 1990; D'Souza et al., 1996; Stankoff et al., 2002). *In vivo* verhindert es die Degeneration von axotomierten Neuronen und vermindert Motordefizite in verschiedenen Mausstämmen mit neuromuskulären Mängeln (Curtis et al., 1993; Mitsumoto et al., 1994; Sendtner et al., 1990; Sendtner et al., 1992). In CNTF defizienten Mäusen konnte ein schwererer Erkrankungsverlauf im Vergleich zu Kontrolltieren nach Induktion einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der Multiplen Sklerose, beobachtet werden (Linker et al., 2002). In der späten Phase der Erkrankung litten CNTF defiziente Mäuse immer noch an Paraplegie, während bei den Kontrolltieren nur noch eine Gangataxie zu erkennen war. Auf der histologischen Ebene kann die erhöhte Suszeptibilität der CNTF defizienten Mäuse durch eine 60 %-ige Verminderung der proliferierenden Vorläuferzellen der Oligodendrozyten zu erklären sein. In einer anderen Studie wurde ganz im Gegensatz zur vorangegangenen die systemische Applikation von CNTF in Wildtyp BL/6 Mäusen untersucht (Kuhlmann et al., 2006). Die Verabreichung von niedrigen Dosen des Zytokins während der akuten Phase einer MOG induzierten EAE, führte nicht zu systemischen Nebenwirkungen, wie Änderungen in der peripheren Immunantwort, zeigte aber einen verminderten Krankheitsverlauf. Es wurde beobachtet, dass die Zahl an perivaskulären Infiltraten und die Menge an aktivierten Mikroglia im Rückenmark reduziert waren. Dieser benefizielle Effekt konnte jedoch nach dem Absetzen der Applikation nicht mehr gehalten werden, wodurch die Inflammation und die Symptome wieder das Niveau der Kontrolltiere einnahmen.

Da CNTF scheinbar ein Schlüsselmolekül in der autoimmunen Demyelinisierung in experimentellen Modellen darstellt, so liegt es Nahe, dass dieses Zytokin auch eine funktionelle Relevanz in der MS haben könnte.

1.4 Brain derived neurotrophic factor (BDNF)

Im Jahre 1982 wurde BDNF als zweites Mitglied der Neurotrophinfamilie entdeckt (Barde et al., 1982). Das reife, biologisch aktive BDNF hat ein Molekulargewicht von 14 kDa und stammt aus dem 32 kDa großen pro-BDNF (Matsumoto et al., 2008). BDNF bildet meist Homodimere, die durch drei Disulfidbrücken miteinander verbunden werden, aber auch Heterodimere mit NT3 und NT4/5 wurden beschrieben (Robinson et al., 1995; Wiesmann and

de Vos, 2001). Im Gegensatz zum konstitutiv sezernierten NGF, wird die Sekretion dieses Proteins nur durch einen Aktivitäts-abhängigen Signalweg reguliert. Das Sortieren des Proteins in den sekretorischen Signalweg hängt von der Sortierungssequenz in der Tertiärstruktur ab. Auch die Carboxy-Peptidase E ist kritisch für die Sekretion (Lou et al., 2005).

Auf molekularer Ebene umfasst das BDNF Gen ca. 50 kb an genomischer DNA und besteht aus 8 verschiedenen Exons. Obwohl die ersten sieben Exons unterschiedliche Promotoren besitzen, codiert nur Exon 8 die Proteinsequenz für BDNF (Liu et al., 2006). Dennoch werden durch alternatives Splicing und die Verwendung von Polyadenylierungs-Stellen mehrere alternative Splicevarianten generiert (Abb. 1.1), woraus man ableitet, dass die verschiedenen Promotoren unterschiedlich reguliert werden bzw. auf die verschiedenen Stimuli unterschiedlich antworten. Im ZNS können alle Splicevarianten auf unterschiedlichen Ebenen detektiert werden, einige unter Ihnen sind sogar auch in peripherem Geweben, wie der Lunge, dem Herzen, dem Dünndarm, den Nieren und den Hoden aktiv (Liu et al., 2006). Diese unterschiedliche Expression des BDNF könnte auf getrennte regulatorische Netzwerke dieses Proteins im ZNS und im Immunsystem zurückzuführen sein. Die genaue Regulation ist bisher jedoch noch ungeklärt.

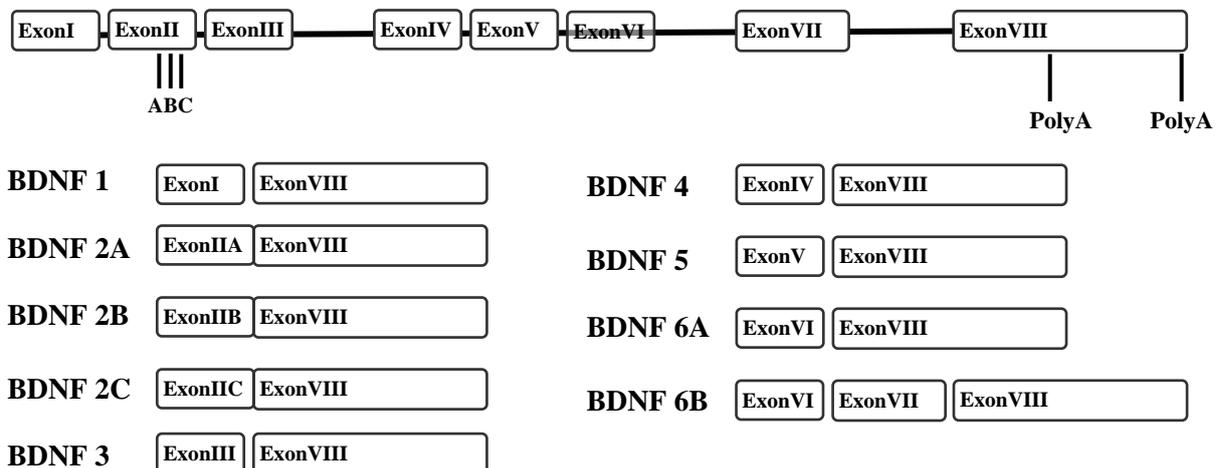


Abb. 1.1: Maus BDNF Genstruktur und *Splice*-Varianten. Die Rechtecke repräsentieren die unterschiedlichen Exons. Die senkrechten Linien deuten auf *Splice*-Stellen innerhalb der Exons und auf alternative Polyadenylierungs-Stellen hin.

Der biologische Effekt von BDNF wird durch die Bindung an spezifische Rezeptoren vermittelt. Dabei unterscheidet man zwischen dem hoch affinen TrkB Rezeptor und den weniger affinen p75^{NTR} Rezeptor, an den auch alle anderen Neurotrophine binden können. Für den TrkB Rezeptor wurden alternative Isoformen nachgewiesen. So kann der *full-length* TrkB Rezeptor noch seine komplette Signalfunktion ausüben, während die verkürzte und sog. *truncated* Isoform nur eine limitierte Signalfunktion besitzt und sogar durch die Bildung von Heterodimeren die Funktion der TrkB Rezeptoren inhibieren kann (Eide et al., 1996). BDNF hat einen direkten Einfluss auf axonales Wachstum (Markus et al., 2002), ist beteiligt an der Modulation von neuronalen Aktivitäten und beeinflusst das Gedächtnis und die Lernfähigkeit (Gorski et al., 2003; Linnarsson et al., 1997). Des Weiteren hat BDNF auch Einfluss auf die synaptische Plastizität durch die Bindung an den prä- und postsynaptischen TrkB-Rezeptor. Dadurch stimuliert es vermutlich die Glutamatausschüttung und inhibiert die GABAerge synaptische Transmission an der Postsynapse (Wardle and Poo, 2003). Im ZNS ist BDNF verantwortlich für das Überleben und die Differenzierung von zahlreichen Neuronenpopulationen, wie z.B. auch im Striatum (Lewin and Barde, 1996). Die Bedeutung des BDNF für die Funktionalität des Gehirns und dessen Erhalt wurde durch den frühen Tod von BDNF-defizienten Mäusen betont, da diese durch den Untergang von viscerio-afferenten Neuronen und dementsprechend auch dem Versagen der Aspiration in einem Alter von 2-3 Wochen versterben. Zudem wurde in heterozygoten BDNF^{+/-} Mäusen starke Verhaltensstörungen, wie ein hohes Maß an Aggressivität und Hyperaktivität, beobachtet. Weiterhin wurde bei diesen Tieren Hyperphagia, Obesität, Verlust der Mechanosensitivität und der Untergang von Neuronen aus dem PNS beschrieben (Carroll et al., 1998; Ernfors et al., 1994; Kernie et al., 2000; Rios et al., 2001).

Im ZNS ist die BDNF Expression nicht nur auf Neuronen begrenzt, sondern wurde auch in glialen Zellen beobachtet. BDNF mRNA Expression z.B. wurde auch in Mikroglia detektiert (Elkabes et al., 1996; Kruse et al., 2007), außerdem ist berichtet worden, dass BDNF die Proliferation von Mikroglia auslöst (Elkabes et al., 1996; Kruse et al., 2007). In Astrozyten hingegen bindet BDNF an den verkürzten TrkB Rezeptor und führt zu einer Kalziumausschüttung aus intrazellulären Kompartimenten (Rose et al., 2003). Durch derartige Studien entwickelt sich das BDNF als ein potenzieller Mediator für Neuronen-Glia-Interaktionen im ZNS.

Im Immunsystem wird BDNF sowohl in primären als auch in sekundären lymphatischen Organen exprimiert. Auf zellulärer Ebene wurde die BDNF mRNA Expression in thymischen Stromazellen detektiert, was eventuell auf einen Einfluss des BDNF auf das Überleben von

Thymozyten in bestimmten Entwicklungsstufen in der Thymozytenreifung zurückzuführen ist (Maroder et al., 1996). Zudem wurde sowohl BDNF mRNA als auch das BDNF Protein in T-Zellen, B-Zellen und Monozyten nachgewiesen (Kerschensteiner et al., 1999; Kruse et al., 2007). Da unreife Thymozyten (Maroder et al., 1996) und Th1 Zellen (Besser and Wank, 1999) den TrkB Rezeptor exprimieren und der BDNF Gehalt in aktivierten T-Zellen erhöht ist (Kerschensteiner et al., 1999), wird in diesen Zellen eine auto- bzw. parakrine Wirkungsweise des BDNF vermutet, dies ist jedoch noch nicht bewiesen. Im Fall der B-Zellen wurde eine Blockierung der B-Zellentwicklung in der Prä-BII Phase in jungen BDNF *knock-out* Mäusen beobachtet (Schuhmann et al., 2005). Dieser Block führt zu einem drastischen Abfall der B-Zellzahl in bestimmten Reifestadien sowie zur Minimierung der Zellzahl an reifen B-Zellen in der Peripherie und demonstrierte zugleich die bedeutende Funktion des BDNF in der Entwicklung dieses Zelltyps. Zusätzlich zu seiner Expression im Immunsystem, könnte BDNF auch zu immunologischen Veränderungen im ZNS führen. Diese Auswirkungen beinhalten die Hemmung der MHC-Klasse-II Induktion und der kostimulatorischen Moleküle auf Mikroglia, was einen Einfluss auf die Antigenpräsentation hätte (Neumann et al., 1998).

In den vergangenen Jahren hat sich immer deutlicher herausgestellt, dass Neurotrophine auch in der Pathogenese vieler neurodegenerativer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen, wodurch sie sich auch gleichzeitig als vielversprechende therapeutische Ziele anbieten. Bei der Parkinson Erkrankung z.B. handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die durch die Degeneration von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra und des Striatums charakterisiert wird. Das Neurotrophin BDNF wird von dopaminergen Neuronen exprimiert und für deren Entwicklung und Erhalt benötigt. Genau aus diesem Grund scheint BDNF auch in der Pathogenese von Parkinson beteiligt zu sein. Man konnte feststellen, dass die BDNF mRNA Menge in der Substantia nigra von Parkinson Patienten reduziert war (Howells et al., 2000). Im Tiermodell des Parkinson führte die Applikation von BDNF mit Hilfe einer Injektion ins Striatum bzw. der Zufuhr von transplantierten Fibroblasten, die in der Lage sind humanes BDNF zu sezernieren, zu einer geringeren Zerstörung der dopaminergen Neuronen (Frim et al., 1994; Shults et al., 1995). Im Gegenteil dazu zeigte eine Studie, in der die BDNF Expression inhibiert wurde, dass dopaminerge Neurone vermehrt zerstört wurden (Porritt et al., 2005). Diese Untersuchungen zeigen, dass die neuroprotektiven Eigenschaften des BDNF immer stärker in den Vordergrund treten. So auch z.B. in der am häufigsten auftretenden Demenzerkrankung bei älteren Menschen, der Alzheimer Erkrankung. Diese zeichnet sich neuropathologisch durch Neuronenverlust, extrazelluläre Einlagerungen von Amyloid Plaques, intrazellulären Einlagerungen von hyperphosphoryliertem tau,

neurofibrillären Verwicklungen und lokalen Entzündungsreaktionen aus. Die neuropsychologischen und neuropsychiatrischen Symptome der Alzheimer Erkrankung resultieren womöglich aus einer verminderten cholinergen Funktion, die mit dem Verlust von cholinergen Neuronen einhergeht (Davies and Maloney, 1976; Winblad et al., 1993). An dieser Stelle wird eine Funktion des BDNF in der Pathogenese dieser Erkrankung vorgeschlagen, da dieses Neurotrophin in der Lage ist auf cholinerge Neurone zu wirken. Zudem reguliert BDNF die synaptische Plastizität und spielt deshalb eine Schlüsselrolle in der Gedächtnisformation und dessen Speicherung (Hellweg and Jockers-Scherubl, 1994). So ist es nicht verwunderlich, dass im Hippocampus und im Neocortex von Alzheimer Patienten die BDNF mRNA (Connor et al., 1997; Garzon et al., 2002; Holsinger et al., 2000; Phillips et al., 1991) und das BDNF Protein (Ferrer et al., 1999; Hock et al., 2000; Michalski and Fahnstock, 2003; Peng et al., 2005) sowie der spezifische Rezeptor TrkB (Allen et al., 1999; Ferrer et al., 1999) geringer exprimiert werden. Zu den Funktionen von BDNF zählt die Dephosphorylierung des tau Proteins (Elliott et al., 2005), wodurch eine Verbindung zwischen BDNF und der tau Pathologie als sehr wahrscheinlich erscheint.

Auch BDNF Genpolymorphismen scheinen eine Rolle in degenerativen Erkrankungen zu spielen. So führt eine G zu A Substitution dazu, dass am Codon 66 des BDNF Gens die Aminosäure Valin (Val) durch Methionin (Met) ersetzt wird (Huang et al., 2007). Dieser Polymorphismus wird mit der Anfälligkeit für einige psychische und neurologische Erkrankungen wie z.B. der Schizophrenie, in Verbindung gebracht (Rosa et al., 2006). Zwischen der Anfälligkeit für die MS und diesem Polymorphismen konnte bislang keine eindeutige Verbindung hergestellt werden (Lindquist et al., 2005). Dennoch wurde beobachtet, dass in Anwesenheit des Met Allels in MS Patienten die graue Substanz stärker erhalten blieb, ohne jedoch einen signifikanten Einfluss auf neuropsychologische Parameter zu nehmen (Zivadinov et al., 2007).

Um jedoch die genaue Funktion des BDNF in neurodegenerativen Erkrankungen zu erfassen, sind weitere Studien erforderlich.

1.5 Die Multiple Sklerose (MS) und das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

MS ist die häufigste chronische neurologische Erkrankung im jungen Erwachsenenalter, und betrifft häufiger Frauen in einem Verhältnis von circa 3:2. Die charakteristischen frühen

Symptome des schubförmigen Erkrankungsverlaufs sind sensorischen Störungen sowie die optische Neuritis, während die Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten erst in den späteren Erkrankungsstufen auftauchen und zu starken Einschränkungen im fortschreitenden MS-Verlauf führen (Noseworthy et al., 2000). In den vergangenen 15 Jahren wurde verstärkt versucht erkrankungslindernde Therapien zu entwickeln, vor allem für die frühe Phase der Erkrankung. Jedoch ist die Effizienz solcher Therapieansätze bis heute noch unbefriedigend und eine vollständige Heilung ist noch nicht in Sicht. Ein komplexes Zusammenspiel von genetischen- und Umweltfaktoren tragen zu dieser vermutlich autoimmunen Pathogenese der MS bei, bei der die genaue Ätiologie noch ungeklärt ist.

Die klassischen histopathologischen Eigenschaften der MS-Läsionen sind die Inflammation, Demyelinisierung und die Gliose in der weißen Substanz (Frohman et al., 2006), wobei sich die neueren Untersuchungen auch auf die Pathologie der grauen Substanz konzentrieren (Stadelmann et al., 2008). Die Krankheitssymptome, die mit den MS-Läsionen einhergehen sind Koordinationsschwierigkeiten, Spastizität, visuelle und sensorische Beeinträchtigungen, Gedächtnisstörungen, Probleme in der kognitiven Verarbeitung von Information sowie Depressionen (Hauser and Oksenberg, 2006). Mit 85 – 90 % ist die häufigste Art der Multiplen Sklerose die schubförmig remittierende Form der Erkrankung, die doppelt so viele Frauen betrifft als Männer. Charakteristisch dafür ist, dass die Betroffenen abwechselnde Phasen der Erkrankung und Erholung durchlaufen, bei der in der Erholungsphase die Symptome teilweise wieder abklingen. Bei den meisten Patienten, die unter der schubförmig remittierenden Form von MS leiden, geht die Erkrankung nach einigen Jahren in die sekundär progredient verlaufende Form über, bei der die Erholungsphasen ausbleiben und sich die Symptome kontinuierlich verstärken. Ähnlich der sekundär progredienten Form der Erkrankung verläuft auch die zweithäufigste Form der Multiplen Sklerose, nämlich die primär progrediente Form, die ca. 10 – 15 % der Patienten betrifft. Hierbei zeichnet sich die Erkrankung durch eine kontinuierliche Verschlechterung des Krankheitsbildes von Anfang an der Erkrankung aus, ohne dass der Patient jegliche Erholungsphasen durchläuft. Diese Form der Erkrankung bricht zu einem späteren Zeitpunkt aus und ist stärker unter Männern verbreitet als unter Frauen (Sospedra and Martin, 2005).

Die Ätiologie der Multiplen Sklerose ist zwar unbekannt, jedoch geht man davon aus, dass sich die Anfälligkeit für diese Erkrankung aus genetischen und Umweltfaktoren zusammensetzt. So wurde z.B. beobachtet, dass die Erkrankung unter Trägern der Allele HLA-DR*1501 und HLA-DQ*0601 häuft (Olerup and Hillert, 1991). Was den eventuellen Beitrag von Umweltfaktoren zur Erkrankung betrifft, so wurde interessanterweise beobachtet,

dass sich die Multiple Sklerose hauptsächlich auf die Nordhemisphäre konzentriert. Dies kann natürlich auch auf ein genetisch prädispositionierten Genpool zurückzuführen sein, aber auch Umweltfaktoren wie z.B. Infektionen können das erhöhte Erkrankungsrisiko begründen. Zudem konnten Migrationsstudien zeigen, dass Menschen, die vor dem 15. Lebensalter aus einem Gebiet mit einem hohen Anfälligkeitsrisiko in ein Gebiet umziehen, welches ein niedrigeres Risiko besitzt, das geringere Erkrankungsrisiko erwerben (Sospedra and Martin, 2005).

Es ist allgemein akzeptiert, dass die Multiple Sklerose durch CD4+ T-Zellen vermittelt wird (Hafler, 2004). Durch den Kontakt mit Antigen beladenen APC's werden autoreaktive T-Zellen aktiviert, dabei ist allerdings noch umstritten wo das erste Antigen*priming* stattfindet, im ZNS oder den peripheren lymphatischen Organen (McMahon et al., 2005). Für die Initiation der Erkrankung konnte jedoch gezeigt werden, dass autoreaktive T-Zellen die Bluthirnschranke passieren und im ZNS auf Myelinantigene reagieren. Die genauen Antigene, die für das *Priming* der autoreaktiven T-Zellen verantwortlich sind, sind unbekannt, jedoch konnten Tiermodelle zeigen, dass vor allem MBP (Myelinbasisches Protein), PLP (Proteolipoprotein) und MOG (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein) mögliche Kandidaten sind. Aber auch andere T-Zellspezifitäten, wie z.B. MAG (Myelin assoziiertes Protein), MOBP (Myelin assoziiertes Oligodendrozytenbasisches Protein) oder OSP (Oligodendrozyten spezifisches Protein) konnten identifiziert werden (Sospedra and Martin, 2005). Nach der T-Zellaktivierung wird der ganze Entzündungsprozess durch die Freisetzung von Zytokinen und anderen proinflammatorischen Mediatoren, die zur Aktivierung von ansässigen Makrophagen und Mikroglia führt, in Gang gesetzt. Daraufhin kommt es zu einer verstärkten Permeabilität der Bluthirnschranke, was zum Einstrom von T-Zellen, Antikörpern und Komponenten des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, NK Zellen, Granulozyten und Komplement führt. Die Folge ist Schädigung von Axonen und Oligodendrozyten, die schließlich zu den bereits beschriebenen Symptomen der Multiplen Sklerose führt (Keegan and Noseworthy, 2002). Das Ausmaß dieser Schädigung zwischen den unterschiedlichen Formen der Multiplen Sklerose ist variabel (Hemmer et al., 2006). Neben autoreaktiven CD4+ T-Zellen scheinen auch CD8+ T und B Lymphozyten an der Pathogenese der Multiplen Sklerose beteiligt zu sein. In diesem Zusammenhang wird ein Erklärungsmodell vorgeschlagen, bei dem die CD4+ T-Zellen zwar für die Initiation der Multiplen Sklerose verantwortlich sind, aber dass hauptsächlich CD8+ T-Zellen für Zellschädigung während den Schüben und chronischen Phasen der Multiplen Sklerose verantwortlich sind (Friese and Fugger, 2005). Die genaue Rolle der B Lymphozyten in der

Pathogenese der MS ist umstritten und noch nicht ganz geklärt. Eins der wichtigsten Diagnosekriterien der MS ist das Vorhandensein von myelinspezifischen Antikörpern im Liquor (CSF; Cerebrospinale Flüssigkeit) der MS Patienten (Hemmer et al., 2006), deren Anstieg mit der Verschlechterung von Krankheitssymptomen während der Schübe korrelierte. Diese Antikörper konnten auch in MS Plaques und Gebieten mit aktiver Demyelinisierung nachgewiesen werden (Sospedra and Martin, 2005). Diese Beobachtungen sprechen für eine Beteiligung von B Lymphozyten an der Pathogenese der MS, wobei das Ausmaß ihrer Beteiligung immer noch ungeklärt ist.

Der Erkrankungsverlauf sowie die histopathologischen Merkmale der MS können in einigen Tiermodellen nachgestellt werden, wobei das wohl wichtigste Tiermodell die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist (Gold et al., 2006). EAE kann in anfälligen Tieren, meist Inzuchtnagerstämme, durch die Immunisierung mit einem ganzen Myelinprotein oder einem speziellen (Myelin) Antigen in Adjuvant ausgelöst werden. Dafür wurden in den letzten Jahrzehnten spezielle enzephalitogene Epitope von potenziellen Autoantigenen identifiziert, dazu zählen das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein Aminosäure (AS) 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) und das Proteolipid Protein AS 139-151 (PLP₁₃₉₋₁₅₁). Durch die Immunisierung von verschiedenen Mausstämmen wie z.B. die C57BL/6 Mäuse mit MOG oder SJL Mäuse mit PLP können unterschiedliche Aspekte der MS Erkrankung nachgeahmt werden. So führt z.B. die Induzierung der MOG-EAE in C57BL/6 Mäusen zu einem ersten Schub, dem ein chronischer Erkrankungsverlauf folgt, und der durch Demyelinisierung und degenerative Entwicklungen gekennzeichnet ist (Herrero-Herranz et al., 2008). Die meisten Studien in diesen Modellen sind auf die Hauptakteure ausgerichtet, die an der Immunpathogenese beteiligt sind, wie z.B. die „Th1/Th17“ Immunantworten oder die regulatorischen Elemente. Nur einige wenige Studien behandeln die Bedeutung von Suszeptibilitätsfaktoren für den Gewebeschaden oder dessen Wiederherstellung. In diesem Zusammenhang gewinnen Neurotrophine durch ihren Einfluss auf neuronale und gliale Zellen an Bedeutung und es wird immer stärker bewusst, dass Neurotrophine nicht nur das Zielgewebe beeinflussen, sondern auch die Immunreaktion selbst und somit eine enge Verknüpfung zwischen Nervensystem und Immunsystem schaffen.

1.6 Neuroprotektive Autoimmunität

Neuronen und Gliazellen sind die Hauptquelle für neurotrophe Faktoren. Auch BDNF wird hauptsächlich von Neuronen gebildet, wobei neuere Studien zeigen, dass bioaktives BDNF auch von Immunzellen exprimiert wird (Kerschensteiner et al., 1999). Diese BDNF exprimierenden Immunzellen, sowie der BDNF-spezifische Rezeptor TrkB wurden um verschiedene Läsionen herum in MS Patienten detektiert und gaben Grund zur Annahme, dass das von Immunzellen sezernierte BDNF auch in den Läsionen aktiv sein könnte und dort seine potenziell neuroprotektiven Fähigkeiten ausübt (Kerschensteiner et al., 1999; Stadelmann et al., 2002). In diesem Zusammenhang keimte das so genannte „Konzept der neuroprotektiven Autoimmunität“ auf (Schwartz et al., 1999). Dieses Konzept besagt, dass in entzündlichen Erkrankungen des ZNS, die infiltrierenden Zellen eine ambivalente Funktion ausüben. Auf der einen Seite führt die Infiltration der Leukozyten zum Gewebeschaden, entweder direkt durch die Antigenerkennung und der anschließenden Zellyse oder indirekt durch die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen, die entweder zur Apoptose führen und bzw. oder andere schädlichere Effektorzellen aktivieren. Auf der anderen Seite führt die Infiltration der Leukozyten zur Sekretion von regulatorischen Zytokinen sowie Neurotrophen, wie das BDNF, die potenziell neuroprotektiv wirken können (Stadelmann et al., 2002; Ziemssen et al., 2002). Diese neurotrophen Faktoren können dann in das umliegende entzündete Gewebe eindringen und möglicherweise den Grad des axonalen bzw. neuronalen Schadens begrenzen.

Dieses Konzept wird durch weitere Beobachtungen in Tiermodellen, wie die des experimentellen Modells der Sehnervquetschung und des Rückenmarktraumas unterstützt. In diesen Modellen erhöht die Entzündung das axonale Überleben und verbessert sogar deren Funktionalität (Schwartz and Kipnis, 2001). Solch positive Effekte werden den endogenen T-Zellabhängigen Immunantworten zugesprochen (Yoles et al., 2001). Es existieren ähnliche Arbeiten, die dieses Konzept unterstützen, wie z.B. im Modell der partiellen Quetschung des Sehnervs, wo infiltrierende autoreaktive T-Zellen die Neuronen vor einer sekundären Degeneration schützen (Moalem et al., 1999). In diesen früheren Studien wurden aktivierte T-Zellen systemisch verabreicht, um den protektiven Effekt der autoimmunen Infiltrationen zu untersuchen. Mittlerweile führt eine aktive Immunisierung mit einem Myelin Antigen (z.B. MBP) zu einer angemessenen Immunantwort, die zu einer Protektion in verschiedenen Läsionen führt (Hauben et al., 2000). Ganz im Gegensatz dazu führt die neonatale Immunisierung mit einem Myelin Antigen zur immunologischen Toleranz und verhindert

Protektion, was zu einem verschlimmerten Zustand nach einer Sehnervsverletzung oder Rückenmarksprellung führt (Kipnis et al., 2002). Interessanterweise scheinen natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen die neuroprotektive Autoimmunität zu beeinflussen, denn die Eliminierung dieser regulatorischen Zellen verbessert das Ergebnis nach einer Verletzung, wobei die Injektion dieser Zellen direkt nach einer Verletzung den neuronalen Zelltod erhöht (Kipnis et al., 2002). In einem Ratten EAE-Modell wurden erhöhte BDNF und NT-3 Mengen in infiltrierten Lymphozyten gefunden (Hammarberg et al., 2000; Muhallab et al., 2002), die Menge dieser Neurotrophine in den *Bystander* Zellen war jedoch mindestens genauso hoch manchmal sogar noch höher. Diese Daten deuten darauf hin, dass nach einem demyelinisierenden Angriff die schädigenden Lymphozyten durch die vermehrte Ausschüttung von Neurotrophinen neutralisiert werden. Dieses Konzept wird auch durch das faziale Motoneuronen Transsektionsmodell unterstützt. In diesem Modell ist die CD4+ T-Zellpopulation verantwortlich für den neuroprotektiven Effekt (Serpe et al., 2003), und sowohl residente Mikrogliazellen als auch periphere Antigen-präsentierende Zellen (APC) aus dem Knochenmark fungieren als kritische APCs (Byram et al., 2004). Dennoch sollte eine Verstärkung der so genannten protektiven Immunantwort für die neuronale Protektion nicht favorisiert werden, denn auch Gegenteiliges wurde z.B. nach einer Rückenmarksverletzung bei T-Zellrezeptortransgenen Mäusen, deren T-Zellrezeptor spezifisch für MBP ist, beobachtet. In diesem Ansatz war die *Precursor*frequenz der Antigen-spezifischen T-Zellen sehr viel höher als im Vergleich zu Wildtyp Mäusen, deswegen war die neurologische Dysfunktion nach Immunisierung mit MBP nicht verringert, sondern sehr viel gravierender als in Wildtyp Mäusen. Die Ursache dafür könnte in der vermehrten Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen liegen, welche den neuroprotektiven Effekt der Neurotrophine überwiegen (Jones et al., 2002).

Dennoch kann man zusammenfassen, dass sowohl endogenes als auch exogen appliziertes BDNF das Potenzial hat neuronales und axonales Überleben zu unterstützen, die Remyelinisierung zu verstärken und Immunfunktionen während der autoimmunen Entzündung im ZNS zu regulieren (Hohlfeld et al., 2000).

1.7 Zielsetzung

Im Zentrum dieser Arbeit stehen grundlagenorientierte und klinisch relevante Untersuchungen zum *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF).

Im ersten Ansatz sollte das BDNF auf genetischer Ebene untersucht werden. Die Gruppe von Liu konnte kürzlich zeigen, dass das murine BDNF-Gen verschiedene *Splice*-Varianten besitzt und in verschiedenen Gehirnarealen bzw. peripheren Organen unterschiedlich exprimiert wird. Ziel dieser Untersuchungen ist zu prüfen, ob sich das Expressionsmuster der *Splice*-Varianten im Gehirn von denen in den Immunzellen unterscheidet.

In Ergänzung zu den grundlagenorientierten Untersuchungen sollte auch die klinische Bedeutung des BDNF näher betrachtet werden, denn aufgrund zahlreicher Untersuchungen wird angenommen, dass das von Immunzellen sezernierte BDNF Protein eine neuroprotektive Rolle in der Multiplen Sklerose spielt. Dieser benefizielle Effekt von BDNF soll in der vorliegenden Arbeit vorerst an der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelits (EAE), der experimentellen Form der Multiplen Sklerose, mit Hilfe von T-Zellen, die BDNF überexprimieren, untersucht werden. Diese T-Zellen sollen C57BL/6 Mäusen, bei denen eine EAE induziert wurde, injiziert werden. Eine anschließende Milderung der EAE-Symptome würde die These des neuroprotektiven Charakters von BDNF unterstützen. Für diesen Ansatz sollte die codierende Sequenz des BDNF-Gens in einen lentiviralen Vektor kloniert und dieser anschließend durch lentivirale Transduktion in Zellen einer Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)-spezifischen T-Zelllinie bzw. in antigenspezifische T-Zellen aus einer MOG-spezifischen T-Zellrezeptor-transgenen Maus gebracht werden. Diese Ergebnisse können Hinweise auf die funktionelle Relevanz geben bzw. hilfreich für spätere therapeutische Zwecke sein.

Diese Arbeit soll zusammenfassend die grundlegende Bedeutung des BDNF-Moleküls (*Splice*-Varianten/Regulation) sowie dessen klinische Relevanz im Tiermodell der Multiplen Sklerose untersuchen.

2. Material

2.1 Geräte

Beta-Counter, MikroBeta Trilux	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Brutschrank, Incubator IS-2	Incutec, Mössingen
Brutschrank CO ₂ , Hera <i>cell</i> 240 und Hera <i>cell</i> 150	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer, BD Facs Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Elektronische Präzisionswaage, <i>Basic lite</i> BL3100	Sartorius, Göttingen
Elektrophoresekammer, Agagel Maxi/Mini	Schütt, Göttingen
Feinwaage, CP 124S und BL3100	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 200M	Carl Zeiss Mikroskopie, Oberkochen
Gasbrenner, <i>flammy S</i>	Schütt Labortechnik, Göttingen
Gefrierschrank (-80°C), HFU 586Top	Heraeus Instruments, Hanau
Gewebeinfiltrationsautomat, LeicaTP 1020	Leica-microsystems, Bensheim
H ₂ O-Bidestgerät, Arium®611	Sartorius, Göttingen
Heizblock, Bio TDB-100 <i>Dry Block Heating</i> Thermostat	Biosan, Riega, Lettland
Kühlschrank (4°C), Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank (-20°C), Liebherr Premium no-frost	Liebherr, Ochsenhausen
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Mikroskopie, Jena
Magnetrührer, MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikrotiter Plattenphotometer, Sunrise	Tecan, Crailsheim
Mikrowellengerät, 5001 AKB279/PH	Philips, Eindhoven, Niederlande
Mixer, Vor- <i>Tex-Genie 2</i> TM	Scientific Industries, Vertrieb: Schütt Labortechnik, Göttingen
Multikanalpipette, <i>Research</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Nanodrop, Spectralphotometer ND-100	Peqlab, Erlangen
Netzgerät für die Elektrophorese, Elite 300 Plus	Schütt Labortechnik, Göttingen
Paraffinausgießstation, Leica EG 1160	Leica-microsystems, Bensheim
PCR-Gerät, Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
PH-Meter, inoLab Level 3	Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim
Phasenkontrastmikroskop, Axioskop 40	Carl Zeiss Mikroskopie, Jena
Pipetten, Typ Research (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000 µl Hubvolumen)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettierhilfe, Accu-Jet®	Brand, Wertheim
<i>Real-Time-PCR-Gerät, 7500 Real Time PCR System</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Schlittenmikrotom, Leica SM2000R	Leica-microsystems, Bensheim
Sterilbank, Klasse II HS18	Heraeus Instruments, Hanau
Tischzentrifuge, MiniSpinPlus 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Tisch für Agarose-Gele, TCP-20-M	LTF Labortechnik, Wasserburg
Wasserbad, A100	Lauda, Lauda-Königshofen
Zellerntegerät, FilterMate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Zentrifuge, Multifuge 1 S-R	Heraeus Instruments, Hanau

Zytozentrifuge, Shandon Cytospin 4

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2 Labormaterialien

Deckgläser, 24*60 mm

Menzel-Gläser, Braunschweig

Einwegspritzen, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml

B.Braun, Melsungen

ELISA-Platten, F96 MicroWell Platten,

Nunc, Wiesbaden

MaxiSorp

Flüssigkeits-Blocker-Stift (PapPen),

SCI Science Services, München

Liquid-Blocker Super PAP pen

Glasfaserfilter, printed FiltermatA

Wallac, Turku, Finnland

Glaspipetten, 5 ml, 10 ml, 20 ml

Schütt, Göttingen

Klebefolien für *Real-Time-PCR*-Platten,

Applied Biosystems, Foster City, USA

MicroAmp™ Optical Adhesive Film

Laborhandschuhe, Peha-soft *Powderfree*

Hartmann, Heidenheim

MACS Separation Columns, LS+MS

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Nitril-Handschuhe, Nitra-Tex® EP

Ansell, München

Objektträger, Super Frost Plus, 25 x 75 mm

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Gewebekulturschalen, Ø 5 cm, 10 cm

Sarstedt, Nümbrecht

Gewebekulturflaschen, 75 cm²

BD Biosciences, Heidelberg

Gewebekulturflaschn, BD Primaria,

BD Biosciences, Heidelberg

75 cm²

Kanülen, Sterican, Ø 0,4 x 20 mm, 27G grau; Ø

B.Braun, Melsungen

0,45 x 12 mm, 26G braun

Pasteurpipetten

WU, Mainz

PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)

Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitzen, Gilson gelb und blau,

Sarstedt, Nümbrecht

Kristallpipettenspitzen

Plastikröhrchen, steril, 50 ml und 15 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Reaktionsgefäß, 1,5 ml/ 2 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Round-Bottom-Tube für Durchflusszytometrie,

BD Biosciences, Heidelberg

5ml Polystyrene

Sterilfilter, 0,22 µm GP Express Plus Membran

Millipore, Schwalbach

Sterilfilter

Szintillationswachsblatt, MeltiLexA

Wallac, Turku, Finnland

Well-Platten, Multidish (6, 12, 24, 48),

Nunc, Wiesbaden

Microwell (96)

Zählkammer, Typ Neubauer Improved

Krannich, Göttingen

Zellsiebe, 40 µm

BD Biosciences, Heidelberg

96-Vertiefungsplatten für Real Time PCR,

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

ABgene® PCR Plates Thermo Fast® 69

Detection Plate

2.3 Chemikalien

Agarose	Roth, Karlsruhe
AgNO ₃ (Silbernitrat)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Aquadex	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
CaCl ₂ (Kalziumchlorid)	Roth, Karlsruhe
DAB (Diaminobenzidin)	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Entellan	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fluoromount-G, 25ml	Southern Biotech, Alabama, USA
Glucose	Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Roth, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	Roth, Karlsruhe
HNO ₃ (Salpetersäure)	Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl (Kaliumchlorid)	Roth, Karlsruhe
LB	Roth, Karlsruhe
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
Lymphoprep	PAA, Pasching, Österreich
Methanol	Roth, Karlsruhe
NaN ₃ (Natriumazid)	Roth, Karlsruhe
Natriumbicarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
NaCl (Natriumchlorid)	Roth, Karlsruhe
NaCl (Natriumchlorid) 0,9 %	B.Braun, Melsungen
Na ₂ HPO ₄ (Natriumhydrogenphosphat)	Roth, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O (Natriumhydrogenphosphat Monohydrat)	Roth, Karlsruhe
NH ₃ (Ammoniak)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
Percoll	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Polybrene	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris base	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin, 0,05 % Trypsin / EDTA	Gibco, Invitrogen Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe
UltraPure Destilliertes Wasser DNase, RNase frei	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure Monohydrat	Roth, Karlsruhe

2.4 Lösungen und Puffer

Annexin Puffer

150 mM HEPES pH 7,4
150 mM NaCl
5 mM KCl
2 mM CaCl₂
in H₂O

Coating Puffer für BDNF-ELISA

0,025 M Natriumbicarbonat
0,025 M Natriumcarbonat
in H₂O
pH 9,7

DAB Entwicklerlösung

1 Tablette DAB
75 µl 3 % H₂O₂
ad. 10 ml PBS

EDTA Puffer

3,3 ml EDTA (0,3 M)
ad. 1000 ml H₂O
pH 8,0

Entwicklerlösung für Versilberung nach Bielschowsky

5,4 ml Paraformaldehyd (37 %)
1 Tropfen konz. HNO₃ (65 %)
0,5 g Zitronensäure
ad. 120 ml H₂O

Erythrozyten-Lyse-Puffer

0,1 M NH₄Cl
in H₂O

FACS Puffer

0,1 % BSA
0,1 % Natriumazid
in 1x PBS

MACS Puffer

100 ml 10x PBS
6,7 ml 0,3 M EDTA
5 g BSA
ad 1000 ml H₂O

PBS-Puffer (10x)

400 g NaCl
10 g KCl
71 g Na₂HPO₄
69 g NaH₂PO₄·xH₂O
ad. 5000 ml H₂O
pH 6,7

PBS-Puffer (1x)

100 ml 10 x PBS Puffer
ad. 1000 ml H₂O

Percoll-Verdünnungspuffer

0,02 g BSA
0,2 g Glucose
ad. 20 g 1x PBS

POD-Blockierlösung

8 ml Methanol
1,2 ml Natriumazid (2M)
2 ml H₂O₂ (3 %)

Rückenmark-Resuspensionspuffer

0,02 g BSA
0,2 g Glucose
200 µl DNaseI (10 mg/ml)
ad. 20 g 1x PBS

TBS 50 mM

12,1 g Tris base
18 g NaCl
ad. 2000 ml H₂O
pH 7,5

TBST Waschpuffer für BDNF-ELISA

150 mM NaCl
20 mM Tris HCl pH 7,6
0,05 % Tween
in H₂O

Thymidinlösung

1 ml Thymidin (6,7 Ci/mmol)
ad. 100 ml R0 Medium

Zitratpuffer

2,1 g Zitronensäure-Monohydrat
ad 1000 ml H₂O
pH 6,0

2.5 Medien und Medienzusätze

2.5.1 Medienzusätze

BME (Basal Medium Eagle)	Sigma-Aldrich, Chemie, Taufkirchen
ConA Überstand	Eigenherstellung, IMSF, Göttingen
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
FCS (Fötale Kälberserum)	PAA, Pasching, Österreich
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazyinyl)-ethansulfonsäure	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
RPMI 1640	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
X-vivo	Lonza, Verviers, Belgien

2.5.2 Medien

EH Medium

2,5 mM	HEPES Puffer
1 %	Penicillin (100u/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)
in DMEM	

Medium Mikroglia/Astrozyten

10 %	FCS
1 %	L-Glutamin
1 %	Penicillin (100u/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)
in BME	

R0 Medium

1 %	Penicillin (100u/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)
1 %	L-Glutamine
1 %	NEAA
1 %	Natrium-Pyruvat
in RPMI 1640	

R10 Medium

10 %	FCS
in R0 Medium	

ReMed Medium

5 %	FCS
400 µl/100 ml	β-Mercaptoethanol (0,2 % in A.dest vorverdünnt)
in R0 Medium	

TCGF Medium

R10	Medium
6-10 %	ConA Überstand

2.6 Enzyme, Farbstoffe, Neurotrophine, Seren, Zellstimulanzen

BDNF	PreProtech, Frankfurt
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth, Karlsruhe
ConA (Concanavalin A)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
DAPI (6-diaminidino-2-phenylindole, dihydrochloride)	Molecular Probes, Oregon, USA
DNaseI	Roche, Mannheim
IFN- γ (Interferon-gamma)	Pan Biotec, Aidenbach
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
NDS (Normales Eselserum)	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
NGF	PreProtech, Frankfurt
Pferdeserum	Molecular Probes, Oregon, USA
PMA (Phorbol mystrate acetate)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Propiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Trypanblau	Merck, Darmstadt

2.7 Kits

AB-Komplex	Dako, Hamburg
BDNF E _{Max} Immunoassay Kit	Promega, Mannheim
Jetstar Kit	Genomed, Löhne
Nanofectin Kit	PAA, Pasching, Österreich
New Fuchsin Kit	Dako, Hamburg
Pan-T-Cell-Kit	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.8 Antikörper

Alexa Fluor488 Ziege-anti-Ratte IgG (H+L)	Molecular Probes, Oregon, USA
Alexa Fluor594 Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Molecular Probes, Oregon, USA
Hamster-anti-Maus CD3e-biotinyliert	BD Biosciences, Heidelberg
Hamster-anti-Maus CD69-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Kaninchen-anti-BDNF, polyklonal	Chemicon, Hofheim
Kaninchen-anti-Maus-biotinyliert IgG (H+L)	Dako, Hamburg
Kaninchen-anti-Maus iNOS	Biomol, Hamburg
Kaninchen-anti-pTrkB, polyklonal	Bereitgestellt von M. Chao
Kaninchen-anti-Ratte-biotinyliert IgG (H+L)	Vector via Linaris, Wertheim
Maus-anti-APP	Chemicon, Hofheim
Ratte-anti-Human CD3	Serotec, Wiesbaden
Ratte-anti-Maus CD4-PECy5	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD8-biotinyliert	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD25-biotinyliert	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD62L-biotinyliert	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD44-PE	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte-anti-Maus Mac3	BD Biosciences, Heidelberg
Streptavidin-APC	BD Biosciences, Heidelberg

Ziege-anti-Kanninchen-biotinyliert IgG (H+L)	Vector via Linaris, Wertheim
Ziege-anti-Kanninchen IgG (H+L)	Linaris, Wertheim

2.9 Komponenten der Immunisierung

IFA (Inkomplettes Freundesches Adjuvant)	Becton Laboratories, Baltimore, USA
MOG ₃₅₋₅₅ Peptid	Charité, Berlin
Mycobacterium tuberculosis H37RA	Becton Laboratories, Baltimore, USA
Pertussistoxin	List Biomedicals, Campbell, USA

Komplette Freundesche Adjuvant (CFA)

100 mg	Mycobacterium tuberculosis H37RA
10 ml	Inkomplettes Freundesches Adjuvant

2.10 Tiere

2D2	bereitgestellt durch V.Kuchroo, Boston, USA
C57BL/6	Harlan, Borchon
GFP	Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA
TTIκB+LTH	bereitgestellt durch D. Mathis, Boston, USA und C. Kaltschmidt, Witten-Herdecke

2.11 Komponenten der Real-Time PCR

ABgene Absolute QPCR SYBR Green Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
OligodT-Nukleotide	Invitrogen, Karlsruhe
Platinum®qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe
qRT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
ROX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe

2.12 Primer Proben für die Real-Time PCR

Alle Primer wurden von Microsynth bezogen.

Oligonukleotid	Sequenz (5' -> 3')
β-actin S	ATTGCCGACAGGATGCAGAA
β-actin AS	GCTGATCCACATCTGCTGGAA
β-actin probe	FAM-CAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCA-TAMRA
mBDNF1 S	GCAAAGCCGAACTTCTCACAT
mBDNF2a S	ACAGAGCCAGCGGATTTGTC
mBDNF2b S	AGTTGGCTTCCTAGCGGTGTAG
mBDNF2c S	TGCAAGTGTTTATCACCAGGATCTA
mBDNF3 S	GGGCCGGATGCTTCCTT
mBDNF4 S	CTGCCCTTGATGTTTACTTTGACAAG
mBDNF5 S	GGGATCCGAGAGCTTTGTG
mBDNF6a S	TCCTGAGGAAGTGAAAGTTTTGACT
mBDNF6b S	GATTGCTGAAAATGGTGTGCGTAAA
mBDNF AS	GCAACCGAAGTATGAAATAACCATAG
mBDNF AS2	CGTGGACGTTTACTTCTTTCATG
mBDNF probe	FAM-TTCCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCAT-TAMRA
mBDNF CDS S	ACTTGGCCTACCCAGGTGTG
mBDNF CDS AS	GCATCACCCGGGAAGTGTAC

2.13 Bakterienstamm

Zur Klonierung wurde der *Escherichia coli* Stamm **HB101**: F', hsd S20(r_B⁻, m_B⁻), recA13, ara-14, proA2, LacY1, galK2, rpsL20 (str), xyl-5, mtl-1, supE44, leuB6, thi-1 der Firma Takara verwendet.

2.14 Plasmide

Für die BDNF Überexpression wurde der lentivirale Vektor **pLenti-PGK-EGFP** verwendet, der von Prof. Harald Neumann (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt wurde. Die zur Generierung des Lentivirus notwendigen Plasmide **pMD2-VSV-G**, **pMDLg**, **pRSV-rev** und **pLenti6/V** wurden freundlicherweise von Dr. Ellen Gerhard (Universität Göttingen) bereit gestellt.

2.15 Restriktionsenzyme

Der Restriktionsverdau erfolgte mit den Restriktionsenzymen **BamHI** und **XhoI** in den entsprechenden Puffern der Firma Fermentas.

2.16 Längenstandards

Bei der Agarose-Gelelektrophorese von DNA wurden die Längenstandards **O´GeneRuler Low Range DNA Ladder** und **O´GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder** der Firma Fermentas verwendet.

2.17 Radioaktivität

Für den Proliferationsassay wurde radioaktiv markiertes **Thymidin (Methyl-3H)** der Firma MP Biomedicals verwendet.

2.18 Software

Für die Anfertigung der Dissertation wurden folgende Softwareprogramme verwendet.

EndNote 7.0.0	Researchsoft, London, England
Software für die RT-PCR und deren Auswertung. Sequence Detection Software Version 1.3.1., 7500 System SDS-Software	Applied Biosystems, Foster City, USA
Software zur Messung von RNA-Konzentrationen, Nano Drop ND-100 V.3.1.2.	Coleman Technologies Inc., Orlando, USA
Software für die Durchflusszytometrie, Cell Quest™ pro Version 5.1.1.	BD Biosciences, Heidelberg
Software zur Aufnahme von Bildern am Fluoreszenzmikroskop, Image-Pro®MDA Version 5.1.2.59	Media Cybernetics, Inc., Bethesda, USA
Software zur Erstellung von Grafiken, GraphPad Prism 4.03 für Windows	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Microsoft®Office 2003	Microsoft Corporation, Redmont, USA

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolation von RNA

Bei einer RNA-Isolation erhält man eine Gesamt-RNA bestehend aus ribosomaler- (rRNA), transfer- (tRNA) und messenger RNA (mRNA). Die Ausbeute kann dabei von Gewebe zu Gewebe variieren, wobei der Anteil an mRNA lediglich ca. 2 % der Gesamt-RNA ausmacht. Dieser Gehalt ist jedoch ausreichend für viele Anwendungen, wie z.B. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).

Die RNA-Aufreinigung wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen bzw. das Gewebe in je 350 µl RLT-Puffer (Kitkomponente, versetzt mit 1% β-Mercaptoethanol) aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Nach Zugabe von 350 µl 70 %-igem Ethanol (hergestellt mit RNase-freiem Wasser) wurde der Ansatz auf eine RNeasy Säule überführt und zentrifugiert (30 Sekunden, Raumtemperatur, 10.000 rpm). Die Säule wurde auf ein frisches Auffanggefäß gesteckt und einmal mit 700 µl RWI (Kitkomponente) und zweimal mit 500 µl RPE (Kitkomponente) gewaschen (30 Sekunden, Raumtemperatur, 10.000 rpm). Der Durchfluss wurde dabei jedes Mal verworfen. Um die RNA wieder aus der Säule zu eluieren, wurde diese mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser beladen und zentrifugiert (60 Sekunden, Raumtemperatur, 10.000 rpm). Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde mittels Spektralphotometrie durch die Absorption bei 260 nm ermittelt. Zur Quantifizierung der Konzentration fand folgende Formel Anwendung:

$$\text{RNA ng/}\mu\text{l} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

3.1.2 Umschreiben von mRNA in cDNA

Bei der Reversen Transkription wird RNA in DNA, die so genannte *complementary* DNA (cDNA), umgeschrieben, dabei macht man sich zu Nutze, dass eukaryotische mRNA am 3' Ende einen polyA-Schwanz besitzt. An dieses Ende können oligodT-Nukleotide binden und als Primer für die RNA-abhängige DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, dienen. Das Enzym ist dann anschließend in der Lage mRNA in cDNA umzuschreiben.

Für den Ansatz vereinigt man zunächst folgende Komponenten:

200 ng RNA	x μ l
500 ng/ μ l OligodT-Nukleotide	1 μ l
10 mM dNTPs	1 μ l
Wasser	x μ l ad 12 μ l Endvolumen

Dieser Ansatz wird für 5 Minuten bei 65°C inkubiert, wobei die Sekundärstrukturen der RNA aufschmelzen und der Primer an die RNA hybridisieren kann. Um diesen Zustand zu halten wird die Probe anschließend auf Eis gelegt und noch folgende Komponenten hinzugefügt:

5 x First strand Puffer	4 μ l
200 U/ml Superskript II Reverse Transkriptase	1 μ l
Wasser	3 μ l

Die Reverse Transkription findet nun für 50 Minuten bei 42°C statt und wird dann anschließend durch Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 75°C für 15 Minuten beendet.

3.1.3 Quantifizierung von mRNA-Transkripten mittels Real-Time PCR

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur *in-vitro* Amplifikation von DNA. Die PCR-Technik unterteilt sich in drei Schritte:

1) Denaturierungs-Phase

In diesem Schritt wird die doppelsträngige DNA bei 92-95°C denaturiert, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren gespalten werden.

2) *Annealing*-Phase

In dieser Phase lagern sich die Oligonukleotide (Primer) komplementär an die Einzelstränge an. Wichtig dabei ist, dass die Temperatur auf eine für die Primer spezifische Temperatur abgesenkt wird. Diese spezifische Temperatur (Schmelztemperatur) hängt von der unterschiedlichen Basenzusammensetzung und Länge der Primer ab.

Sie lässt sich annäherungsweise mit folgender Formel berechnen:

$$T_m = (G+C) \times 4^\circ\text{C} + (A+T) \times 2^\circ\text{C}$$

3) Elongations-Phase

Die Elongation erfolgt über eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-DNA-Polymerase), die aus dem thermophilen Prokaryonten *Thermus aquaticus* isoliert wird. Sie hat ihr Aktivitäts-optimum bei 72°C und benötigt zusätzlich zur zu amplifizierenden DNA Primer mit freien 3' OH-Gruppen, Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) und Mg²⁺.

Diese drei Phasen werden ca. 25–40-mal wiederholt, wobei die DNA-Menge exponentiell vervielfältigt wird.

Ein finaler Elongationsschritt von fünf Minuten gewährleistet einen vollständigen Abschluss der Polymeraseaktivität, anschließend wird die Reaktion durch das Herabkühlen auf 4°C beendet.

Das Besondere an der Real-Time PCR ist, dass man mit dieser Methode die Menge an mRNA Transkripten quantifizieren kann. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden, dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge an PCR-Produkten zu.

Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt durch den Einsatz von DNA-interkalierenden Farbstoffen, wie z.B. dem SYBR Green, welches an jede doppelsträngige DNA binden kann und somit nur eine geringe Spezifität aufweist. Diesem Nachteil kann durch eine zusätzliche Schmelzkurvenanalyse entgegenwirkt werden, da jedes DNA-Fragment einen spezifischen Schmelzpunkt hat. Bei dieser Analyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur kontinuierlich von 50°C bis zu 95°C erhöht wird. Jedes Fragment hat je nach Basenlänge einen spezifischen Schmelzpunkt, an dem der Doppelstrang denaturiert und dabei den interkalierten Fluoreszenzfarbstoff freisetzt. Diese Fluoreszenzabnahme wird registriert und dem Schmelzpunkt zugeordnet. Mehrere *Peaks* an unterschiedlichen Schmelzpunkten würden unspezifische Amplifikationen bedeuten.

Wesentlich spezifischer hingegen sind sogenannte TaqMan-Sonden. Dabei handelt es sich um genspezifische Sonden, die an einem Ende mit einem „Quencher“ und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. TAMRA und FAM) markiert sind. Solange der „Quencher“ an dieser Sonde hängt, wird die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors unterdrückt. Wird aber diese Sonde an die DNA synthetisiert, so wird dieser „Quencher“ durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase entfernt. Die Fluoreszenz des

Reporters wird nun nicht mehr durch den „Quencher“ unterdrückt und kann gemessen werden.

In dieser Arbeit wurden Real-Time-PCR Analysen sowohl mit SYBR Green als auch mit Taq-Man-Sonden durchgeführt. Beta-Aktin diente dabei als endogene Kontrolle für die relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode.

Folgende Primer wurden bei Mikrosynth (Lindau, Deutschland) erworben und für die Real-Time-PCR verwendet:

Oligonukleotid	Sequenz (5' -> 3')
β -actin S	ATTGCCGACAGGATGCAGAA
β -actin AS	GCTGATCCACATCTGCTGGAA
β -actin probe	FAM-CAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCA-TAMRA
mBDNF1 S	GCAAAGCCGAACTTCTCACAT
mBDNF2a S	ACAGAGCCAGCGGATTTGTC
mBDNF2b S	AGTTGGCTTCCTAGCGGTGTAG
mBDNF2c S	TGCAAGTGTTTATCACCAGGATCTA
mBDNF3 S	GGGCCGGATGCTTCCTT
mBDNF4 S	CTGCCTTGATGTTTACTTTGACAAG
mBDNF5 S	GGGATCCGAGAGCTTTGTG
mBDNF6a S	TCCTGAGGAAGTGAAAGTTTTGACT
mBDNF6b S	GATTGCTGAAAATGGTGTCGTA
mBDNF AS	GCAACCGAAGTATGAAATAACCATAG
mBDNF AS2	CGTGGACGTTTACTTCTTTCATG
mBDNF probe	FAM-TTCCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCAT-TAMRA
mBDNF CDS S	ACTTGGCCTACCCAGGTGTG
mBDNF CDS AS	GCATCACCCGGGAAGTGTAC

Der Ansatz für die Real-Time PCR bestand aus folgenden Komponenten:

Für Taq-Man Sonden:

2 x Invitrogen's Platinum SuperMix-UDG	12,5 µl
Primer (sense und antisense, 10 pM)	je 1 µl
Taq-Man Sonde	1 µl
ROX	1 µl

Für SYBR Green:

2 x ABgene Absolute QPCR SYBR Green Mix	12,5 µl
Primer (sense und antisense, 10 pM)	je 1 µl
ROX 1/1000 verdünnt	1 µl

Alle Proben wurden als Triplikate in eine für die Real-Time PCR spezielle 96-Loch-Platte angesetzt. Dafür wurden je 15 µl des PCR-Ansatzes mit 10 µl der cDNA (1:25 verdünnt) in ein well gegeben. Als Referenzgen wurde bei jeder PCR das Maus Beta-Aktin mitgeführt. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe einer Real-Time-PCR Maschine (7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

Das PCR-Programm für die Taq-Man Sonden lautete wie folgt:

2 Minuten	50°C	
2 Minuten	95°C	
15 Sekunden	95°C] 40-50 Zyklen
1 Minute	60°C	

Das PCR-Programm für den SYBR Green Assay unterschied sich lediglich im zweiten PCR-Schritt, in dem die DNA-Polymerase nicht 2 Minuten bei 95°C für die Aktivierung benötigt, sondern 15 Minuten. Außerdem wurde bei diesem Ansatz stets nach dem PCR-Lauf noch die Dissoziationskurve bestimmt.

3.1.4 Klonierung / Ligation / Transformation

Unter Klonierung versteht man die Integration eines DNA-Fragments in einen Vektor, welcher anschließend zur Vervielfältigung in Bakterien transformiert wird. Der Vorgang der Integration wird auch Ligation genannt, wobei entweder überstehende Enden (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*) miteinander ligiert werden.

In diesem Ansatz wurde das BDNF-Gen aus dem pT7T3D-PacI Vektor (RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin) herausamplifiziert. Dabei wurden Primer eingesetzt, die jeweils an den 5'-Enden eine Restriktionsschnittstelle für die Endonukleasen BamHI und XhoI besitzen. Nach der Amplifikation wurden die Enden des BDNF Gens sowie der lentivirale Vektor pLenti6/V5 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit diesen beiden Endonukleasen geschnitten (siehe Kap. 3.1.6) und so für die nachfolgende Ligation vorbereitet.

Der Ligationsansatz setzte sich zusammen aus:

pLenti6/V5 Vektor	95 ng/ml
Insert	100-150 ng/ml
10x T4 DNA Ligase Puffer	1 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Wasser	ad 10 µl

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und die Ligase am nächsten Tag 10 Minuten bei 65°C inaktiviert.

Für die Transformation der kompetenten HB101 *E.coli* Zellen wurden 5 µl des Ligationsansatzes verwendet. Die Hitzeschocktransformation wurde mit 25 µl *E.coli* Zellen und 5 µl Ligationsansatz durchgeführt. Dieser Ansatz wurde zunächst für ca. 20 Minuten in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 45 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad überführt und schließlich 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl SOC-Medium wurde der Ansatz bei 37°C für 1 Stunde auf einem Rundschtüttler geschüttelt. Die Ausplattierung erfolgte auf je zwei LB-Agar-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Der Erfolg der Ligation bzw. Transformation wurde durch einen Restriktionsverdau im Anschluss an eine Plasmidaufreinigung überprüft.

3.1.5 Plasmidaufreinigung

Bakterienklone wurden von der LB-amp Platte ausgewählt und über Nacht in 3 ml LB-Medium (versetzt mit 50 µg/ml Ampicillin) bei 37 °C auf einem Rundschüttler inkubiert. Diese Vorkultur wurde genutzt um weitere 50 ml LB-amp-Medium anzuimpfen, die ebenfalls über Nacht bei 37°C im Rundschüttler inkubiert wurden. Für die Plasmidaufreinigung wurde das Jetstar Kit (Genomed, Löhne) benutzt. Die Bakterienkultur wurde abzentrifugiert (4600 rpm, 10 Minuten, Raumtemperatur) und in 4 ml E1 (Kitkomponente, enthält RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml E2 (Kitkomponente) wurde der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 ml E3 (Kitkomponente) hinzugegeben und das Reaktionsgefäß wurde invertiert. Die in diesem Schritt ausgefällten Kalium-SDS-Flocken, präzipitierten Proteinen und chromosomale DNA, die über einen weiteren Zentrifugationsschritt (4600 rpm, 10 Minuten, Raumtemperatur) pelletiert wurden. Der Überstand wurde auf eine bereits mit 10 ml E4 Puffer (Kitkomponente) äquilibrierte Midisäule überführt. Nach dem der Überstand durch die Säule geflossen war, wurde diese zweimal mit 10 ml E5 Puffer (Kitkomponente) gewaschen, dabei wurde der Durchfluss jedes Mal verworfen. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 5 ml E6 (Kitkomponente) auf die Säule gegeben, der Durchfluss in einem frischen Reaktionsgefäß gesammelt und mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Die Plasmid-DNA wurde bei 13.000 rpm und 4°C für 30 Minuten pelletiert und anschließend mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 20-50 µl H₂O aufgenommen.

3.1.6 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind katalytisch aktive Enzyme, die die Fähigkeit haben doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen spalten zu können. Falls beide Stränge an der gleichen Stelle geschnitten werden, so entstehen glatte Enden (*blunt ends*), werden die Stränge jedoch an unterschiedlichen Stellen geschnitten so entstehen 5'- bzw. 3'- Überhänge (*sticky ends*). Laut Definition schneidet eine Einheit (*unit*) einer Endonuklease 1 µg DNA in einer Stunde, dabei hängt die katalytische Aktivität auch stark von der Reinheit der DNA ab, da diese durch Verunreinigungen gehemmt wird.

Der Ansatz eines Restriktionsverdau, der in dieser Arbeit standardmäßig angewandt wurde, war:

DNA	1 µg
Enzym	10 Einheiten
10x dazugehöriger Restriktionspuffer	2 µl
Wasser	ad 20 µl

Der Restriktionsverdau wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

3.1.7 DNA-Agarose Gelelektrophorese

Bei der sogenannten Gelelektrophorese wandern geladene Moleküle in einem elektrischen Feld, dabei variiert die Wanderungsgeschwindigkeit je nach Größe und Form der Moleküle sowie ihrer elektrischen Ladung. Die Porengröße eines Agarosegels wird durch die Konzentration der Agarose bestimmt, in dieser Arbeit wurden hauptsächlich 1 %-ige Gele verwendet.

Zur Sichtbarmachung der aufgetragenen DNA, wird dem Gel Ethidiumbromid hinzugefügt, welches zwischen die Basen der DNA interkaliert und unter UV-Licht sichtbar wird. Die elektrophoretische Trennung der Nukleinsäuren wurde über ein digitales Bildverarbeitungssystem dokumentiert.

Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch das Auftragen eines Längenstandards (O'Generuler Low Range bzw. O'Generuler 100bp DNA Plus, Fermentas) ermittelt.

3.1.8 BDNF ELISA

Der Enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (EIA) bzw. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dient als immunologisches Nachweisverfahren für Proteine, Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone und Toxine. Dabei bedient man sich spezifischer Enzym-gekoppelter Antikörper, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden und durch eine vom Enzym katalysierte Reaktion das Vorhandensein des Antigens nachweisen. Das Reaktionsprodukt führt üblicherweise zu einem Farbumschlag, dessen

Signalstärke die Antigenkonzentration widerspiegelt und somit auch quantitative Aussagen möglich macht.

Bei dem so genannten Sandwich ELISA werden zwei Antikörper verwendet, die an das nachzuweisende Antigen binden. Der erste Antikörper (*coating* Antikörper) wird an eine spezielle 96-Loch-Mikrotiterplatte gebunden. Die zu untersuchende Probe wird anschließend in die Vertiefungen gegeben, so dass das spezifische Antigen an den Antikörper binden kann. Der Detektions (*detection*)-Antikörper ist ebenfalls spezifisch und bildet durch die Bindung an das Antigen den Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex, und somit das so genannte *Sandwich*. Das zusätzliche Hinzufügen eines Enzym- (hier Meerrettichperoxidase, HRP) gekoppelten sekundären Antikörpers ermöglicht die Spaltung eines anschließend applizierten Substrats (Chromogen), welches zu einem Farbumschlag führt. Für eine quantitative Analyse, wird neben den eigentlichen Proben auch eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen auf die 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben, die als Kalibrierungskurve für das gemessene Signal dient.

Für den Nachweis des BDNF Proteins, wurde das BDNF E_{Max} Immunoassay Kit (Promega, Mannheim) verwendet. Zunächst wurde der *coating* Antikörper 1:1000 mit dem *coating* Puffer verdünnt und je 100 µl in eine spezielle 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der mitgelieferte 5 x Block & Sample Puffer wurde 1:5 mit A.dest verdünnt und auf die zuvor mehrmals mit Waschpuffer gewaschene Platte gegeben. Mit diesem Puffer wurde der Plattenboden 1 h lang bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach einem weiteren Waschschrift wurden je 100 µl des Standards und der Proben aufgetragen. Der Standard setzte sich dabei zusammen aus einer Verdünnungsreihe des humanen BDNF Proteins (Kitkomponente) in 1x Block & Sample Puffer (500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 0 pg/ml), während die eigentlichen Proben nicht verdünnt wurden. Die Platte wurde für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Rundschüttler inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Der Detektions-Antikörper (Anti-Human BDNF pAb, Kitkomponente) wurde 1:500 in 1 x Block & Sample Puffer verdünnt und je 100 µl pro Vertiefung auf die Platte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur auf einem Rundschüttler wurde die Platte erneut gewaschen. Der Enzym-gekoppelte sekundäre Antikörper (Anti-IgY HRP Conjugate, Kitkomponente) wurde 1:200 in 1x Block & Sample Puffer verdünnt, wovon je 100 µl pro Vertiefung auf die Platte gegeben wurde. Die Platte wurde 1h bei Raumtemperatur auf einem Rundschüttler inkubiert und anschließend gewaschen. Für die Farbreaktion wurden jeweils 100 µl des Substrats (TMB One Solution, Kitkomponente) pro

Vertiefung der Platte gegeben und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rundschtüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von je 100 μ l 1 M HCl pro Vertiefung gestoppt. Die Absorption wurde mittels Mikrotiterplatten-Photometer (Sunrise, Tecan) bei 450 nm bestimmt. Die absoluten Proteinmengen wurden mit Hilfe einer Standardkurve und des Software Programms GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) ermittelt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus primären und sekundären lymphatischen Organen

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension aus primären (Thymus) und sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten und Milz) wurden die Organe mit Hilfe eines 5 ml Spritzenstempels durch ein Zellsieb (40 μ m) gerieben. Das Sieb sowie der Stempel wurden mehrer Male mit EH-Medium gespült. Die Zellen wurden anschließend in EH-Medium aufgenommen und zweimal gewaschen (1200 rpm, 8 Minuten, 4°C). Nach Resuspension der Zellen in frischem Medium, wurde die Zellzahl bestimmt.

3.2.2 Restimulation von T-Zellen aus einer Zelllinie

MOG-spezifische T-Zellen einer Zelllinie müssen stets nach 6-7 Tagen in Kultur restimuliert werden. Hierfür wurde die Milz einer C57Bl/6 Maus entnommen, welches zur Zellvereinzelung mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb gerieben wurde. Die Zellen, die als Antigenpräsentierende Zellen fungieren sollen, wurden in EH Medium aufgenommen und zentrifugiert (1200 rpm, 8 Minuten, 4°C). Nach einem weiteren Waschschrift wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet für 13 Minuten mit 30 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden anschließend in ReMed Medium aufgenommen. Parallel dazu wurden auch die MOG-spezifischen T-Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 8 Minuten, 4°C) und in ReMed Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahlen wurden die Zellen im Verhältnis von $0,4 \times 10^6$ T-Zellen + $2,5 \times 10^6$ Milzzellen / ml zueinander gegeben, mit 20 μ g/ml MOG versetzt und für 48 h kultiviert (37°C, 5 % CO₂). Nach Zugabe von 1/2 Volumen TCGF Medium wurden die Zellen weitere 24 h kultiviert (37°C, 5 % CO₂). Um in Anschluss

daran die Milzzellen von den MOG-spezifischen T-Zellen zu trennen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (siehe Kap. 3.2.3).

Diese Zellen wurden entweder zur Expansion in TCGF Medium weiterkultiviert oder für Zellkulturexperimente verwendet.

3.2.3 Aufreinigung von Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Nach der Restimulation von T-Zellen (siehe Kap. 3.2.2) einer MOG-spezifischen T-Zelllinie wurden diese von den unerwünschten Zellen in der Zellkultur (APCs etc.) mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. Dafür wurde das Zellgemisch zentrifugiert (1200 rpm, 8 Minuten, 4°C) und anschließend in 6 ml R10 Medium aufgenommen. Dieser Zellsuspension wurden 3 ml Lymphoprep untergeschichtet und erneut zentrifugiert (3000 rpm, 30 Minuten, 4°C, ohne Bremse). Die in der Interphase lokalisierten T-Zellen wurden abgenommen und erneut mit R10 Medium gewaschen (1200 rpm, 8 Minuten, 4°C). Das Zellpellet wurde anschließend je nach Verwendungszweck in das entsprechende Medium aufgenommen.

3.2.4 Astrozyten- / Mikrogliapräparation

Mikroglia und Astrozyten wurden aus primären Glia Cokulturen gewonnen. Dafür wurde neugeborenen Mäusen (1-3 Tage alt) das Gehirn entnommen und mit Hilfe einer 5 ml Pipette eine Zellsuspension erzeugt. Nach einem Waschschrift mit PBS, wurde die Zellsuspension von jeweils zwei Tieren in eine 75 cm² Primariakulturflasche (Falcon, Becton/Dickinson, Heidelberg) überführt und mindestens 9-14 Tage in Kultur gehalten.

Die Isolation von Mikroglia aus dieser Cokultur wurde durch das so genannte Abschütteln erreicht, wobei die Zellkultur 7 Stunden lang bei 37°C und 150 rpm geschüttelt wird. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Mikrogliazellen mit dem Überstand abgenommen, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 Minuten bei 4°C und 1200 rpm abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit dem entsprechenden Medium wurden die Zellen in 7 ml Medium aufgenommen und in eine vorher mit FCS beschichtete 75 cm² Primariaflasche überführt. In dieser Phase wurde durch eine Einstündige Inkubation bei 37°C die Adhäsion der Mikrogliazellen auf die Flaschenoberfläche bewirkt. Dieser Schritt sollte zu einer reineren

Zellpopulation führen, da Mikroglia in der Lage sind schneller auf die beschichtete Oberfläche zu binden als die restlichen Zellen der Mischkultur. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und die Mikrogliazellen von der Flaschenoberfläche mit 1 x Trypsin/EDTA und einer Inkubation von 3-4 Minuten bei 37°C abgenommen. Nach einem finalen Waschschrift mit dem entsprechenden Medium wurden die Zellen in einer angemessenen Menge Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Die Isolation der Astrozyten aus dieser Cokultur erfolgte nach dem Abschütteln und Entfernen der Mikroglia mit dem Überstand. Die adhärenen Astrozyten wurden mit 1 x Trypsin/EDTA und einer Inkubation von 3–4 Minuten bei 37°C von der Plastikoberfläche abgelöst. Nach einem Waschschrift mit Medium und einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 4°C und 1200 rpm wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und in eine 10 cm Petrischale ausplattiert. Bei einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur adhärten noch mögliche Mikroglia kontaminationen auf der Plastikoberfläche und ermöglichten so eine reinere Astrozytenpopulation. Dieser Aufreinigungsschritt wurde ein zweites Mal durchgeführt, bevor der Überstand bei 1200 rpm und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert wurde. Die Zellen wurden abschließend in einer angemessenen Menge Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Nach dem Ausplattieren wurde den Astrozytenzellen die Möglichkeit gegeben über Nacht zu adhären, bevor sie in einem Experiment verwendet wurden.

3.2.5 Isolation von mononukleären Leukozyten aus dem Rückenmark

Die Isolation mononukleärer Leukozyten aus dem Rückenmark wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Tiere mit 0,9 % NaCl perfundiert und anschließend das Rückenmark herauspräpariert. Diese wurden mit einem Spritzenstempel zerkleinert, in 20 ml Rückenmarksresuspensionspuffer aufgenommen und zentrifugiert (1600 rpm, 10 Minuten, 4°C). Währenddessen wurden die Percollgradienten hergestellt, indem 4 ml 45 % Percoll in ein 15 ml Röhrchen pipettiert und mit 2 ml 70 % Percoll mit Hilfe einer 2 ml Spritze unterlegt wurde. Zuletzt wurde die Rückenmarkssuspension, die zuvor in 6 ml 30 % Percoll aufgenommen wurde, vorsichtig mit einer 2 ml Spritze auf den Gradienten aufgetragen und zentrifugiert (2300 rpm, 20 Minuten, 4°C, ohne Bremse). Dabei setzte sich das Myelin oben auf dem Gradienten ab und konnte problemlos abgesaugt werden. Die Leukozyten hingegen

sammelten sich in den beiden Interphasen an und wurden vorsichtig mit einer 2 ml Spritze abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Leukozyten wurden mit FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (1600 rpm, 10 Minuten, 4°C). Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

3.2.6 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Die magnetische Zellsortierung dient zur Aufreinigung von spezifischen Leukozyten-subpopulationen aus verschiedensten Ausgangsmaterialien. Dabei nutzt man Antikörper, die an magnetische Kügelchen (*beads*) gekoppelt sind und entweder direkt an Zellepitope binden oder an Antikörper, die bereits an die Zellen gebunden haben. Die markierten Zellen können dann mittels eines Magneten von den restlichen Zellen abgetrennt werden. Dafür wird die Zellsuspension auf eine Säule gegeben, deren Matrix aus ferromagnetischen Stahlpartikeln besteht. Nach Anlegen des magnetischen Feldes, bleiben alle magnetisch markierten Zellen in der Säule hängen, während die übrigen unmarkierten Zellen hindurchfließen können. Nach Entfernung des Magneten, können auch die magnetisch markierten Zellen eluiert werden. Je nach Bedarf kann entweder eine negative Depletion (unmarkierte Zellen) oder eine positive Selektion (markierte Zellen) durchgeführt werden.

3.2.7 Aufreinigung von T-Zellen

Die Aufreinigung der T-Zellen wurde in diesem Fall über eine negative Depletion mit dem PAN-T-Cell-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dafür wurden die Milzen von C57BL/6 Tieren entnommen und vereinzelt (siehe Einzelzellgewinnung). Je 1×10^7 Milzzellen wurden mit 40 μ l MACS Puffer und 10 μ l biotinyliertem Antikörper Cocktail (anti-CD11b, CD45R, CD5 und Ter-119) 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden erneut pro 1×10^7 Milzzellen 30 μ l MACS Puffer und 20 μ l anti-Biotin MicroBeads hinzugegeben und 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit MACS Puffer aufgefüllt, zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, 4°C) und je 1×10^8 Zellen wurden in 500 μ l MACS Puffer aufgenommen. Zur Trennung der markierten Zellen von den unmarkierten T-Zellen wurden LS Säulen verwendet, die eine Kapazität von ca. 1×10^5 - 10^8 Zellen haben. Die Säulen wurden an einen Magneten gespannt und vor Gebrauch mit 3 ml MACS Puffer prä-

äquiliert. Je 1×10^8 Zellen wurden auf eine Säule gegeben, wobei der Durchfluss gesammelt wurde. Die Säule wurde anschließend 3-mal mit je 3 ml MACS Puffer gewaschen. Der Durchfluss mit den unmarkierten T-Zellen wurde bei jedem Schritt gesammelt. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 8 Minuten, 4°C) wurde die Zellzahl bestimmt.

Die Reinheit der T-Zellen wurde bei jeder Aufreinigung mittels Durchflusszytometrie überprüft und lag durchschnittlich bei ca. 90 %.

3.2.8 Zellstimulationen

Da die verwendeten Zelltypen zum Teil unterschiedlich stimuliert wurden, ist im Folgenden eine Übersicht der verschiedenen Stimulationen aufgeführt.

Makrophagen wurden in dieser Arbeit mit PBS aus dem Peritoneum der Maus ausgewaschen. Nach 2 Waschschrinen mit PBS (1200 rpm, 8 Minuten, 4°C) wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in R10 Medium aufgenommen und über Nacht anwachsen lassen. Nach einem Medienwechsel am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS über Nacht stimuliert. Auch Mikroglia (siehe Kap. 3.2.4) wurden ebenso wie Makrophagen mit 10 ng/ml LPS über Nacht stimuliert. Astrozyten (siehe Kap. 3.2.4) hingegen wurden über Nacht mit 100 u/ml IFN- γ stimuliert. Für die Stimulation von T-Zellen (siehe Kap. 3.2.7) und Thymozyten (siehe Kap. 3.2.1) wurden 50 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin verwendet. Die Stimulation der T-Zellen erfolgte über 2-3 Tage, während Thymozyten lediglich über Nacht stimuliert wurden.

3.2.9 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurde der Zählansatz je nach Bedarf mit Trypanblau verdünnt. 10 μ l der Verdünnung wurden dann unter das Deckgläschen der Neubauer-Zählkammer gegeben und 4 x 16 Felder ausgezählt. Für die Bestimmung der Zellzahl pro ml wurde folgende Formel verwendet: (gezählte Zellzahl/4) x Verdünnung x 10^4 (Kammerfaktor)

3.2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder auch fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS) genannt dient zur Detektion, Messung und Analyse von Signalen, die von einzelnen Zellen enthalten werden, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. Hierdurch erhält man die Möglichkeit gleichzeitig mehrere physikalische und Fluoreszenzparameter einer einzelnen Zelle in einer größeren Zellpopulation quantitativ zu bestimmen. Der Durchflusszytometer misst wie Zellen das Licht absorbieren und reflektieren und welche Fluoreszenz sie emittieren, wodurch die relative Größe und die optische Dichte berechnet werden kann. Des Weiteren ermöglicht der Gebrauch von spezifischen Antikörpern, die mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, den Nachweis der Expression von bestimmten Molekülen auf und in der Zelle. Durch den Einsatz von Nukleinsäurebindenden fluoreszierenden Farbstoffen kann zusätzlich der DNA-Gehalt in einer Zelle festgestellt werden.

Alle FACS-Messungen wurden mit dem FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt und die Daten mit dem Programm CellQuest™ analysiert.

3.2.10.1 Extrazelluläre Färbungen

In dieser Arbeit wurden alle im Anschluss aufgeführten Antikörper und Reagenzien bei BD Biosciences erworben und für extrazelluläre Färbungen eingesetzt:

CD8-bio, CD4-PECy5, CD3e-bio, CD44-PE, CD25-bio, CD62L-bio, CD69-PE, Propidiumiodid

Pro Färbung wurden ca. $2,5 \times 10^5$ – 1×10^6 Zellen in 100 μ l FACS-Puffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen gegeben. Die gewünschte Antikörperkombination wurde in einer 1:500 Verdünnung zu den Zellen gegeben und 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen und 5 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Falls die Antikörper Biotingekoppelt waren, war ein weiterer Färbeschritt notwendig, da Biotin kein Fluorochrom enthält und somit alleine nicht im Durchflusszytometer detektierbar ist. In diesem Fall war ein weiterer Inkubationsschritt mit Fluorochromassoziertem Streptavidin notwendig, welches an das Biotin bindet. Dafür wurden nach dem Waschschrift die Zellen erneut in 100 μ l FACS-Puffer aufgenommen und eine 1:500 Verdünnung des zweiten Antikörpers dazugegeben. Nach einer

Inkubation von 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen mit 4 ml FACS-Puffer aufgefüllt und bei 1200 rpm und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Eine Ausnahme zu diesem Protokoll bildete die Apoptosefärbung mit Propidiumiodid. Hier wurden die Zellen in 100 µl Annexin-Puffer aufgenommen und mit 20 µl Propidiumiodid (50µg/ml) versetzt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln wurde dem Ansatz weitere 250 µl Annexin-Puffer hinzugefügt und ohne einen weiteren Waschschrift wurden die Proben im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.11 Transfektion

Durch die Transfektion kann Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle transferiert werden. Falls die transfizierte DNA schnell wieder abgebaut wird, wie in diesem Fall, so spricht man von einer transienten Transfektion. Die Transfektion erfolgte nach dem Prinzip der Lipofektion, bei dem kationische Lipide verwendet werden, an die die negativ geladene Plasmid-DNA bindet. Dabei entstehen größere Komplexe, die von den Zielzellen aufgenommen werden.

Für die Lipofektion wurde das Kit Nanofectin (PAA, Pasching, Österreich) verwendet, dafür wurden HEK-Zellen in eine 6-Loch-Platte ausgesät und so lange kultiviert (37°C, 5 % CO₂) bis sie eine Konfluenz von ca. 60–70 % aufwiesen. Wenn dies der Fall war, wurde 2 Stunden vor der Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen in je 2 ml R10 pro Loch aufgenommen. Zur Vorbereitung des DNA-Lipid-Komplexes wurden 2-3 µg DNA in 100 µl NaCl (150 mM) aufgenommen, während 9,6 µl des Nanofectins in ebenfalls 100 µl NaCl (150 mM) aufgenommen wurden. Nachdem die Ansätze separat vermischt und kurz abzentrifugiert wurden, wurde zum Nanofectin-Gemisch die DNA-Lösung hinzugegeben, gut vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Nanofectin/DNA-Gemisch tröpfchenweise auf die HEK-Zellen pipettiert, nochmals geschwenkt und für 4 Stunden kultiviert (37°C, 5 % CO₂). Nach Ablauf dieser 4 Stunden wurde die Transfektion mit einem Medienwechsel gestoppt. Nach 24–48 Stunden wurde der Erfolg mittels eines Reporter-Fluoreszenzgens bzw. dem Nachweis des Zielgens überprüft.

3.2.12 Proliferationsassay

Der Proliferationsassay dient zur Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen, die durch den Einbau von radioaktiv markierten [^3H]-Thymidin in die neu synthetisierte DNA gemessen wird. Demnach ergibt sich, dass je mehr Radioaktivität gemessen wird, umso mehr [^3H]-Thymidin eingebaut wurde bzw. umso stärker die Zellen proliferiert haben.

Der Proliferationsassay wurde routinemäßig mit der Restimulation von T-Zellen mitgeführt, um sicherzustellen, dass die Restimulationen erfolgreich waren und die Zellen weiterhin proliferieren. Dafür wurden 2×10^4 T-Zellen mit $1,25 \times 10^5$ Milzzellen (vorher mit 30 Gy bestrahlt) in 100 μl ReMed aufgenommen und in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte gegeben. In jeweils 3 Vertiefungen wurden 10 μl R0, MOG₃₅₋₅₅ (Endkonzentration 2 $\mu\text{g/ml}$) bzw. ConA (Endkonzentration 125 ng/ml) hinzupipettiert und für 48 h kultiviert (37°C, 5 % CO₂). Nach dieser Kultivierungszeit wurde pro Vertiefung der 96-Loch-Platte jeweils 25 μl (entspricht 1,25 μCi , verdünnt in R0) der [^3H]-Thymidin-Lösung hinzugefügt und der Ansatz für weitere 16 h weiterkultiviert. Nach Beendigung der Kultivierungszeit wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellerntegerätes (FilterMate, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) auf Glasfaserfilter (printed FiltermatA, Wallac, Turku, Finnland) geerntet, während nicht eingebaute Radioaktivität heraus gewaschen wurde. Nach der Trocknung der Glasfaserfilter bei 60°C für 1 Stunde, wurde ein Szintillationswachsblatt (MeltiLexA, Wallac, Turku, Finnland) auf dem Filter geschmolzen (kurz bei 60°C) und bei Raumtemperatur wieder abgehärtet. Die Radioaktivität wurde mittels eines Beta-Counters (MikroBeta, Trilux, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) gemessen.

3.2.13 Überlebensassay mit murinen Dorsalwurzelganglien Zellen

Der Überlebensassay wurde mit Hilfe von Prof. Dr. Stefan Wiese (Ruhr-Uni-Bochum) durchgeführt. Im Anschluss wird die Vorgehensweise kurz zusammengefasst.

Zur Isolation der Wurzelganglienzellen wurden Mausembryonen von Tag 12,5 verwendet. Nach Präparation der Neuronen wurden diese mit Trypsin (0,1 % Endkonzentration) für 30 Minuten bei 37°C behandelt. Der Verdau wurde mit serumhaltigem Medium (DMEM, 10% Pferdeserum) gestoppt, in eine 10 cm Kulturschale ausplattiert und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert (5 % CO₂). Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension wieder von der Kulturplatte aufgenommen, gezählt und auf 4-Loch Kulturplatten (Greiner) mit einer Zellzahl

von 3000 Zellen pro Loch ausplattiert. Eine Stunde nach dem Ausplattieren wurden neurotrophe Faktoren (NGF 10 ng/ml, BDNF 10 ng/ml und 0,1 ng/ml) hinzu gegeben. Die erste Auszählung der ausplattierten Zellen erfolgte nachdem alle Zellen auf der Oberfläche der Kulturschale angeheftet waren, was nach ca. 4 Stunden erfolgte. Die zweite Auszählung erfolgte an Tag 1. An beiden Zeitpunkten wurden 5 Gesichtsfelder (1,9 mm²/Feld) pro Loch im Lichtmikroskop ausgezählt.

3.2.14 Herstellung lentiviraler Partikel

Die lentiviralen Partikel wurden von Dr. Ellen Gerhardt (Universitätsmedizin Göttingen) generiert. Im Anschluss erfolgt eine kurze Beschreibung der Vorgehensweise.

Zur Generierung lentiviraler Partikel wurden zunächst 293T Zellen in einer 15 cm Kulturschale so expandiert, dass sie 24 Stunden vor Transfektion eine Konzentration von ca. $1,25 \times 10^7$ / 15 cm Kulturschale besaßen. 2 Stunden vor Transfektion wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Pro 15 cm Kulturschale wurde folgender Transfektionsansatz pipettiert:

9 µg	pMD2-VSV-G (Hülle)
16,25 µg	pMDLg (Kernverpackungsplasmid)
6,25 µg	pRSV-rev (Reverse Transkriptase)
25 µg	pLenti6/V (Transfer Vektorplasmid)

Dies wurde zusammen mit 0,1 x TE/H₂O (Verhältnis 2:1) auf 1125 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 125 µl 2,5 M CaCl₂ und kurzem vortexen, wurde dem Transfektionsansatz tröpfchenweise 1250 µl 2 x HBS hinzugefügt, während auf höchster Stufe auf einem Vortexer der Ansatz vermischt wurde. Sofort nach 2 x HBS Zugabe wurde der komplette Ansatz auf die 293T Zellen gegeben und für 14–16 Stunden in Kultur gehalten (37°C, 5 % CO₂). Nach dieser Kultivierungszeit wurde ein Medienwechsel durchgeführt und nach 48–72 Stunden nach Transfektion die Überstände eingesammelt. Die viralen Überstände wurden über einen Filter gegeben und bei 50.000 x g für 2 Stunden zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit PBS und anschließender Zentrifugation (50.000 x g, 2 Stunden) wurden die viralen Partikel in einer angemessenen Menge x-vivo Medium aufgenommen und in Aliquots bei -80°C gelagert.

3.2.15 Lentivirale Transduktion

Lentivirale Partikel (ca. 1 μ l pro 1×10^6 Zellen) wurden zusammen mit 10 μ g/ml Polybrene (Sigma-Aldrich, München) zur MOG spezifischen T-Zellsuspension (ca. 1×10^6 /ml) hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C in *x-vivo* Medium (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien) inkubiert. Anschließend wurde die T-Zellsuspension in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und für 90 Minuten bei 2200 rpm und 32°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen 2-mal mit Medium gewaschen (2200 rpm, 5 Minuten, 32°C). Nach dem Waschschrift wurden für die nachfolgende i.v. Injektion je 10×10^6 Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen. Im Fall der *in vitro* Experimente wurden die Zellen nach dem Waschschrift in TCGF Medium in einer Konzentration von 1×10^6 /ml aufgenommen, in eine entsprechende Kulturschale ausplattiert und für 4 bis 6 Tage kultiviert (37°C, 5 % CO₂).

Die HEK Zellen wurden anders als die T-Zellen in DMEM Medium mit 10 % FCS aufgenommen und mit den Lentiviralen Partikeln zusammen für 24 Stunden in Kultur gehalten (37°C, 5 % CO₂). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und weitere 4 bis 6 Tage kultiviert.

Die BDNF Überexpression wurde im Überstand der Zellkultur mittels ELISA (Promega, Heidelberg) ermittelt, während die GFP Expression mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert wurde.

3.3. Tierexperimentelle Methoden

3.3.1 Tiere

C57BL/6 Mäuse wurden bei Harlan (Borchen) erworben, transgene 2D2 Mäuse (Bettelli et al., 2003), die einen MOG₃₅₋₅₅ spezifischen T-Zellrezeptor beherbergen wurden durch V.K. Kuchroo (Boston, USA) bereitgestellt und Grün Fluoreszenz Protein transgene (GFP) Tiere wurden über Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. C57Bl/6 Tiere, in denen der Transkriptionsfaktor NF κ B spezifisch in T-Zellen unterdrückt ist (TTI κ B+LTH) wurden durch D. Mathis (Boston, USA) (Labrecque et al., 2001) und C. Kaltschmidt (Witten-Herdecke) (Fridmacher et al., 2003; Kaltschmidt et al., 2006) bereitgestellt. Alle Mäuse wurden in der Tierhaltung des Instituts für Multiple Sklerose Forschung in Göttingen gehalten

bzw. weitergezüchtet. Sämtliche Experimente wurden durch die Regierung von Niedersachsen genehmigt und durch autorisierte Personen überwacht.

3.3.2 Induktion und klinische Evaluation einer aktiven MOG₃₅₋₅₅-EAE

Für die Induktion einer aktiven MOG₃₅₋₅₅-EAE wurde den Mäusen subcutan rechts und links neben dem Schwanzansatz eine Emulsion aus 50µg MOG₃₅₋₅₅ Peptid (Charité, Berlin) in PBS und der gleichen Menge an Mycobacterium tuberculosis H37RA enthaltendem CFA injiziert. Den Tieren wurde zusätzlich am Tag der Immunisierung und 48 Stunden später *intrapitoneal* Pertussis toxin (400ng pro Maus) verabreicht. Die Tiere wurden täglich gewogen und auf klinische Symptome der EAE hin untersucht. Die Stärke der EAE wurde an Hand einer zehnstufigen Skala ermittelt:

0 = gesund; 1 = reduzierter Schwanztonus; 2 = schlaffe Schwanzlähmung, 3 = Fehlen reflektorischer Ausgleichbewegungen beim Gehen; 4 = Gangataxie; 5 = leichte Lähmung der Hinterbeine; 6 = Plegie eines Beines oder mittelgradige Lähmung beider Hinterbeine; 7 = Paraplegie mit kompletter Lähmung beider Hinterbeine; 8 = Tetraparese mit (leichter) Lähmung auch der vorderen Extremitäten; 9 = moribund; 10 = tot.

Die Tiere wurden spätestens bei einem *Score* von 7 aus tierschutzrechtlichen Gründen aus dem Versuch genommen.

3.3.3 *intra venöse* (i.v.) Injektion

Für die i.v. Injektionen wurden je 10 Millionen T-Zellen pro Tier aufgereinigt, mit dem Lentivirus infiziert und anschließend in 200 µl PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine 1 ml Spritze aufgezogen und mit einer 27G (0,4 x 20 mm) Kanüle in die Schwanzvene appliziert.

3.4. Histologie und Immunzytochemie

Für alle histologischen Untersuchungen wurden die Mäuse zunächst mit Paraformaldehyd perfundiert und anschließend das Rückenmark herauspräpariert. Das Rückenmark wurde in gleichgroße Stücke zerteilt, im Gewebeeinfiltrationsautomat (LeicaTP 1020) entwässert, in Paraffin eingebettet und als 3 µm dicke Querschnitte auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden über Nacht bei 56°C fixiert und bis zur Färbung bei Raumtemperatur gelagert.

3.4.1 CD3 / Mac-3 / GFP Färbung

Direkt vor der Färbung wurden die Schnitte wieder deparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe gegeben, indem sie 2-mal für 10 Minuten in Xylol und anschließend für jeweils 2 Minuten 2-mal in 99 %, 96 % und 70 % Ethanol und zuletzt in A.dest eingetaucht wurden. Um die Proteine, die in ihrer räumlichen Struktur durch die Fixierung verändert wurden, wieder zu renaturieren war eine Mikrowellenvorbehandlung vor der Färbung notwendig. Dafür wurden die Schnitte in ein mikrowellengeeignetes, hitzestabiles Gefäß gestellt, welches mit EDTA-Puffer (1mM, pH 8,0) gefüllt war. Nach einer Kochzeit von 38 Minuten wurden die Schnitte zunächst 3-mal in A.dest danach 3-mal in PBS gewaschen. Nach Blockierung der unspezifischen Bindungen mit 10 % BSA/PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur, wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4°C in 1 % BSA/PBS in einer Feuchteammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 3-mal mit PBS gewaschen. Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen (POD) wurden die Schnitte 13 Minuten lang mit einer POD-Blockierlösung (8 ml Methanol, 1,2 ml 2 M NaN₃ und 2 ml 3 % H₂O₂) behandelt und erneut mit PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden wie unten aufgeführt eingesetzt und jeweils in 1 % BSA/PBS verdünnt und 45 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchteammer inkubiert. Nach drei weiteren PBS Waschschrritten wurden die Schnitte mit dem Peroxidase basierten AB-Komplex (DAKO, Hamburg, 1:100 verdünnt in PBS) für 35 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Nach 3-maligem Waschen in PBS wurden die Schnitte etwa 10 Minuten (Mac-3, CD3 und GFP Färbung) bzw. 5 Minuten (APP Färbung) in Diaminobenzidin (DAB) Entwicklerlösung inkubiert und anschließend in A.dest überführt. Die Gegenfärbung erfolgte durch Hämalaun für ca. 30 Sekunden und einer anschließenden Inkubation in A.dest für 10-15 Minuten. Um die Schnitte

abschließend zu entwässern wurden sie durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2-mal für 2 Minuten in 70 %, 96 %, 99 % Ethanol und je zweimal für 10 Minuten in Xylol) gegeben und mit Entellan eingedeckt.

Für die T-Zellfärbung wurde als Primärantikörper ein Ratte anti-Maus CD3 Antikörper (Serotec, Wiesbaden, 1:300) eingesetzt, während für die Makrophagen/Mikroglia Färbung ein Ratte anti-Maus Mac-3 Antikörper (BD Biosciences, 1:200) verwendet wurde. In beiden Fällen diente ein biotinylierter Kanninchen anti-Ratte Antikörper (Vector via Linaris, Wertheim, 1:100) als Sekundärantikörper. Axonaler Schaden wurde mit Hilfe eines APP spezifischen Antikörpers (MAB348, Chemicon, Hofheim, 1:1000) ermittelt, welcher mit einem biotinylierten Kanninchen anti-Maus Sekundärantikörper (DAKO, 1:100) kombiniert wurde. GFP positive Zellen wurden mit einem Huhn anti-GFP Antikörper (Chemicon, 1:300) und einem biotinylierten Esel anti-Huhn Sekundärantikörper detektiert (Jackson, 1:200). Im Gegensatz zu den restlichen Färbungen wurde in der GFP Färbung vor der Blockierung die Schnitte zusätzlich mit 0,2 % Triton-X-100 und 2 % BSA in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3-mal mit PBS gewaschen. Die Spezifität der Färbungen wurde durch eine Negativkontrolle bestätigt, in der der Primärantikörper ausgelassen wurde.

3.4.2 iNOS Färbung

Für die iNOS Färbung wurden die Schnitte sofort nach Anfertigung an Stelle von 56°C über Nacht bei 37°C über Nacht und anschließend noch 1 Stunde bei 60°C inkubiert. Zum entparaffinieren wurden die Schnitte 4-mal für 10 Minuten in Xylol und dann für je 3 Minuten in 50 % / 50 % Xylol-Isopropanol, 100 %, 90 %, 70 %, 50 % Isopropanol und zuletzt in A.dest eingetaucht. Für die Mikrowellenbehandlung wurden die Schnitte in Zitratpuffer (10 mM, pH 6,5) für 38 Minuten gekocht und anschließend in A.dest und TBS gewaschen. Als nächstes wurden die Schnitte in 3 % H₂O₂ (verdünnt in TBS) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit TBS wurden die Schnitte in eine Feuchteammer überführt und mit 10 % Normales Eselserum (*Normal-Donkey-Serum*, NDS) / TBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Blockierlösung wurde ohne weiteren Waschschriff von den Schnitten entfernt und der erste Antikörper anti-iNOS (Kanninchen polyklonal, Assay designs) in einer 1:500 Verdünnung in 1 % NDS / TBS auf die Schnitte gegeben. Nach der Inkubationszeit über Nacht bei 4°C, wurden die Schnitte mit

TBS gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (biotinyliert anti-Kaninchen, 1:200 in TBS) inkubiert. Die Schnitte wurden mehrmals mit TBS gewaschen und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit POX (ExtrAvidin Peroxidase, 1:1000 in TBS) behandelt. Nach mehrmaligen Waschschritten mit TBS wurden die Schnitte für ca. 5 Minuten in DAB Entwicklerlösung eingetaucht. Die Reaktion wurde durch Waschschriffe in TBS und A.dest gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte durch Hämalaun für ca. 15 Sekunden und einer anschließenden Inkubation in A.dest für 10-15 Minuten. Zur Entwässerung wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 1-mal für 3 Minuten in 50 %, 70 %, 90 %, 100 % Isopropanol, 50 % / 50 % Xylol/Isopropanol und je 4-mal für 10 Minuten in Xylol) gegeben und mit Entellan eingedeckt.

Inkubation in A.dest für 10-15 Minuten. Um die Schnitte abschließend zu entwässern wurden sie durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2-mal für 2 Minuten in 70 %, 96 %, 99 % Ethanol und je zweimal für 10 Minuten in Xylol) gegeben und mit Entellan eingedeckt.

3.4.3 Anti-BDNF Färbung von Mäuse - Cytospins

Für die BDNF Lymphozytenfärbung wurden zunächst je 2×10^5 Zellen mittels Cytospin (1200 rpm, 10 Minuten, RT) auf einen Objektträger gebracht und kurz luftgetrocknet. Zur Fixierung wurden die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 % PFA/PBS inkubiert und mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,2 % Triton-X-100 in 2 % BSA/TBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschgang mit TBS wurden die Zellen für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 % BSA/TBS blockiert und über Nacht in einer Feuchtekammer bei 4°C mit dem Primärantikörper (Kaninchen anti-BDNF, Chemicon) in einer 1:100 Verdünnung in 1 % BSA/TBS inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit TBS gewaschen, während der Sekundärantikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), Vector) präabsorbiert wurde, indem 1 µl von diesem mit 1 µl Mausserum für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Der Sekundärantikörper wurde anschließend mit einer 1:800 Verdünnung in 1 % BSA/TBS verdünnt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Während dieser Inkubationszeit wurde der Alkalische Phosphatase basierter AB-Komplex (DAKO) angesetzt, indem 5 µl der Lösung A des Kits mit 500 µl TBS vermischt und anschließend noch 5 µl der Lösung B des Kits dazugefügt wurden. Dieser Ansatz wurde vor der Hinzugabe 30 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert. Nach dem Sekundärantikörper wurden die Zellen mit TBS

gewaschen und mit dem AB-Komplex versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wurden die Zellen erneut mit TBS gewaschen. Für die Farbentwicklung wurde das Kit New Fuchsin (Dako) verwendet. Dafür wurden 60 µl des Fuchsin Chromogens (Kitkomponente) mit 60 µl des Fuchsin *Activating Agents* (Kitkomponente) vermischt und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert bevor 880 µl Puffer aus dem Kit hinzugefügt wurden. Die Entwicklerlösung wurde für ca. 10 Minuten auf die Zellen gegeben, bevor die Reaktion mit A.dest gestoppt wurde. Nach weiteren Waschschritten mit A.dest wurden die Zellen mit Aquadex (Merck) wässrig eingedeckt.

3.4.4 Silberimprägnation nach Bielschowsky

Bei der Imprägnation mit Metallsalzen können Bindegewebsfasern selektiv braunschwarz dargestellt werden. Bielschowsky nutzte dieses Verfahren zur Darstellung von Nervenfasern durch Imprägnation der Neurofibrillen. Dafür wurden die Querschnitte zunächst entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe gegeben (je 2-mal für 10 Minuten in Xylol und 2 Minuten in 99 %, 96 %, 70 % Ethanol und A.dest), anschließend folgte eine Inkubation der Schnitte in vorgewärmten 20 %-igem AgNO_3 für 15 Minuten bei 37°C. Nach dieser Inkubation wurden die Schnitte für jeweils 5 Minuten in A.dest gewaschen, währenddessen wurde zur AgNO_3 -Lösung tröpfchenweise 25 %-iges NH_3 zugegeben bis sich ein brauner Niederschlag bildete, der sich unter weiterer NH_3 -Zugabe wieder auflöste und dabei Ag-Hydroxid entstand. Die Schnitte wurden nach dem Waschschriff 10 Minuten bei 37°C im Dunkeln in der zuvor beschriebenen Ag-Hydroxid-Lösung inkubiert und anschließend zweimal in 0,1 % NH_3 gewaschen bevor sie wieder in die Ag-Hydroxid-Lösung eingetaucht wurden. Dieses Mal wurden der Lösung 11 Tropfen Entwicklerlösung hinzugeben und gut vermischt. Nach einer Entwicklungszeit von 4 Minuten unter konstantem Schütteln wurden die Schnitte erneut zweimal in 0,1 % NH_3 und anschließend in A.dest gewaschen. Die Schnitte wurden entwässert (je 2-mal für 2 Minuten in 70 %, 96 %, 99 % Ethanol und je 2-mal für 10 Minuten in Xylol) und mit Entellan eingedeckt.

3.4.5 pTrkB Fluoreszenzfärbung

Bei der pTrkB Fluoreszenzfärbung wurden erneut die Querschnitte deparaffiniert, durch eine absteigende Alkoholreihe gegeben und anschließend einer Mikrowellenbehandlung in Zitratpuffer (10 mM, pH 6,5) für 38 Minuten unterzogen. Nach mehreren Waschschrinen mit A.dest und PBS, wurden die Schnitte mit 10 % BSA/PBS/0,1 % Triton-X-100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde der Primärantikörper (anti-pTrkB) 1:50 in 1 % BSA/PBS/0,01 % Triton-X-100 verdünnt und mit den Schnitten zusammen in der Feuchtekammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Ziege anti-Kaninchen 594, Molecular Probes) versetzt. Dieser wurde 1:100 in 1 % BSA/PBS/0,01 % Triton-X-100 verdünnt und auf den Schnitten 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Bei einer Einzelfärbung wurden die Schnitte ab diesem Schritt mit PBS gewaschen, anschließend mit DAPI (1:50.000 verdünnt) 45 Sekunden gegengefärbt und erneut mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit Fluoromount (SouthernBiotech) eingedeckt.

Bei einer Doppelfärbung hingegen wurden die Schnitte nach dem Sekundärantikörper mit PBS gewaschen und mit dem zweiten Primärantikörper (Ratte anti-Maus CD3, Serotec bzw. Ratte anti-Maus Mac-3, BD Biosciences) behandelt. Dieser wurde 1:200 mit 1 % BSA/PBS/Triton-X-100 verdünnt und 1 Stunde auf den Schnitten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3-maligem Waschen in PBS, wurden die Schnitte mit dem zweiten Sekundärantikörper (Ziege anti-Ratte 488, Molecular Probes, 1:100 in 1 % BSA/PBS/Triton-X-100 verdünnt) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen mit PBS, wurden die Schnitte wie bereits beschrieben mit DAPI gegengefärbt und eingedeckt.

4. Ergebnisse

4.1 BDNF Expression und Regulation *in vitro*

Die transkriptionelle Regulation von BDNF ist komplex und immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Das murine BDNF Gen (mBDNF), welches ca. 50 Kilobasen an genomischer DNA umspannt, besteht aus 8 verschiedenen Exons, wobei lediglich Exon 8 das codierende Exon darstellt. Die anderen am 5' Ende gelegenen Exons beinhalten voneinander unabhängige Promotoren, exprimieren jedoch alle durch das direkte *Splicing* zu Exon 8 das gleiche BDNF Protein. Es ist dem alternativen *Splicing* und der Verwendung von Polyadenylierungs-Stellen zuzuschreiben, dass aus diesen Acht Exons Neun verschiedene *Splice*-Varianten exprimiert werden. Daher ist es gut möglich, dass durch diese transkriptionelle Komplexität eine sehr genaue Regulation des BDNF in verschiedenen Zelltypen möglich ist.

Ausgehend von dieser Hypothese wurden die verschiedenen *Splice*-Varianten des mBDNF Gens in Zellen des Immunsystems sowie des zentralen Nervensystems (ZNS) untersucht und miteinander verglichen.

4.1.1 Expression und Quantifizierung der mBDNF mRNA *Splice*-Varianten im Gehirn

Zunächst wurde die Expression der mBDNF mRNA *Splice*-Varianten im zentralen Nervensystem (ZNS) untersucht. Dafür wurde ein Real-Time-PCR Ansatz etabliert, der es ermöglichte alle neun *Splice*-Varianten zu amplifizieren. Zu diesem Zweck wurde ein gemeinsamer *reverse* Primer eingesetzt, welcher mit *forward* Primern kombiniert wurde, die alle spezifisch für ein nichtcodierendes Exon waren. Zusätzlich wurde eine für alle Ansätze einsetzbare *TaqMan probe* verwendet. Dieser Ansatz war erfolgreich für alle untersuchten *Splice*-Varianten, mit Ausnahme von Exon 5, wofür separate *forward* und *reverse* Primer eingesetzt werden mussten.

Die erste Analyse erfolgte mit dem Gehirngewebe einer C57Bl/6N Maus, die in fast allen Fällen das erwartete einzelne Amplifikat (Abb. 4.1) aufzeigte. Eine Ausnahme dabei bildete Exon 2, welche nach der Amplifikation bis zu drei unterschiedliche Produkte aufwies (Abb. 4.1). Die Ursache dafür lag vermutlich in den beiden internen *Splice*-Stellen im Exon von mBDNF 2, welche zu diesem unterschiedlichen *splicing* führt. Demnach führt je nach

verwendeter *Splice*-Stelle der Einsatz des *forward* Primers für mBDNF 2A zu drei verschiedenen Amplifikationsprodukten. Falls die erste *Splice*-Stelle benutzt wird, wird ein Amplifikationsprodukt von 109 bp erwartet, während die Benutzung der zweiten und dritten *Splice*-Stelle zu jeweils einem Amplifikationsprodukt von 321 bp bzw. 404 bp führen würde. Diese drei Produkte wurden auch tatsächlich nach der Amplifikation erhalten. Der Gebrauch des *forward* Primers für mBDNF 2B führte zur Amplifikation von 116 bp und 199 bp langen Produkten (Abb. 4.1), die durch die unterschiedliche Verwendung der beiden *Splice*-Stellen entstanden. Die Verwendung des *forward* Primers für mBDNF 2C führte zum erwarteten Amplifikationsprodukt von 121 bp Länge (Abb. 4.1). Somit war die Berechnung der relativen mRNA Expression nur im Fall von mBDNF 1, 3, 4, 5 und 6 möglich.

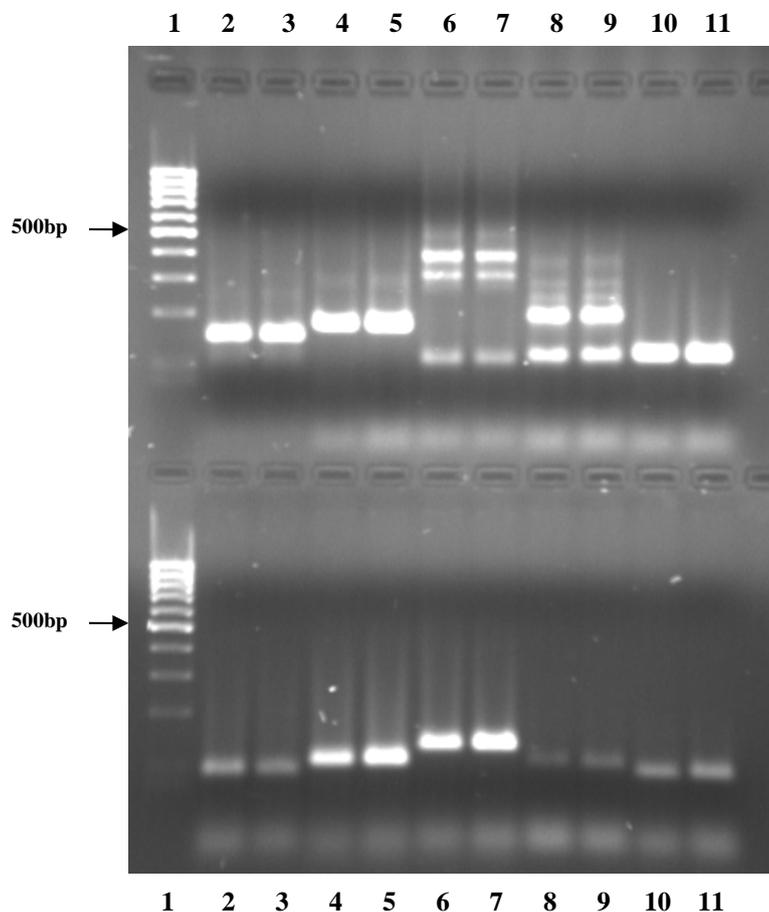


Abb. 4.1: Amplifikation der mBDNF mRNA *Splice*-Varianten im Gehirn von C57Bl/6 Mäusen.

Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR Produkte. **oberes Bild:** 1) MassRuler, O'GeneRuler LowRange, Fermentas, 2,3) Beta-Aktin, 4,5) mBDNF1, 6,7) mBDNF2a, 8,9) mBDNF2b, 10,11) mBDNF2c; **unteres Bild:** 1) MassRuler, O'GeneRuler LowRange, Fermentas, 2,3) mBDNF3, 4,5) mBDNF4, 6,7) mBDNF5, 8,9) mBDNF6a, 10,11) mBDNF6b.

Für die Kalkulation der relativen mRNA Expression wurde in diesem Ansatz die Expression der mBDNF 1 mRNA willkürlich auf 100 % gesetzt und die restlichen *Splice*-Varianten damit verglichen. Daraus ergab sich, dass im Mausgehirn die mRNA von mBDNF 1 und 4 in vergleichbar hohen Mengen exprimiert wurde. Im Vergleich dazu war die Expression der *Splice*-Variante 5 ca. 10-mal und die mRNA der *Splice*-Variante 3 ca. 60-mal niedriger als die Expression der mRNA von mBDNF 1 bzw. 4. Die Expression von mBDNF mRNA 6A und 6B hingegen konnte nur in sehr geringen Mengen detektiert werden und lag bei circa 0,05 % bzw. 0,9 % (Abb. 4.2).

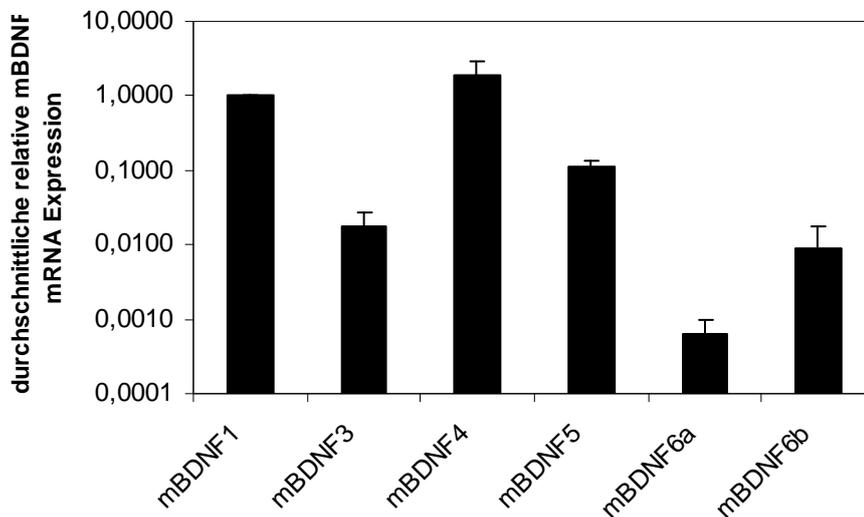


Abb. 4.2: Durchschnittliche relative Expression der mBDNF mRNA *Splice*-Varianten im Gehirn von C57Bl/6 Mäusen. Die relative Expression der mBDNF mRNA Splicevarianten wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode berechnet, wobei die Expression des mBDNF 1 als Kalibrator auf 100 % gesetzt wurde. Der Mittelwert und die Standardabweichung setzen sich zusammen aus 5 unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Tieren.

4.1.2 Expression und Quantifizierung der mBDNF mRNA *Splice*-Varianten in peripheren lymphatischen Organen und Immunzellen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die unterschiedlichen mBDNF mRNA *Splice*-Varianten auch in peripherem lymphatischem Gewebe sowie Immunzellen vorzufinden sind. Tatsächlich konnte in den Proben aus Thymus, Milz und Lymphknoten von C57Bl/6N

Mäusen nur mBDNF 3 mRNA amplifiziert werden, während keine andere *Splice*-Variante, die im Gehirn nachgewiesen wurde, detektierbar war. Quantitative Analysen zeigten eine ähnlich hohe Expression von mBDNF 3 mRNA in den untersuchten lymphatischen Gewebeproben, die jedoch verglichen mit der Expression von mBDNF 3 mRNA im Gehirn deutlich höher war (Abb. 4.3).

Da die BDNF Proteinexpression in T-Zellen und Makrophagen (Kerschensteiner 1999) sowie in T-Zellklonen (Besser und Wank, 1999) bereits beschrieben war, sollte auch in diesen Zelltypen die Expression der mBDNF *Splice*-Varianten untersucht werden. Dafür wurden T-Zellen aus der Milz und peritoneale Makrophagen isoliert. Die Analyse ergab auch in diesem Fall nur die Expression von mBDNF 3 mRNA, dessen Expressionsrate in T-Zellen vergleichbar mit dem in lymphatischen Organen war und somit vermutlich die Hauptquelle für BDNF in diesen Organen darstellt. Die Expression von mBDNF 3 mRNA in Makrophagen hingegen lag bei nur circa 20 % der Expression im Gehirn (Abb. 4.3).

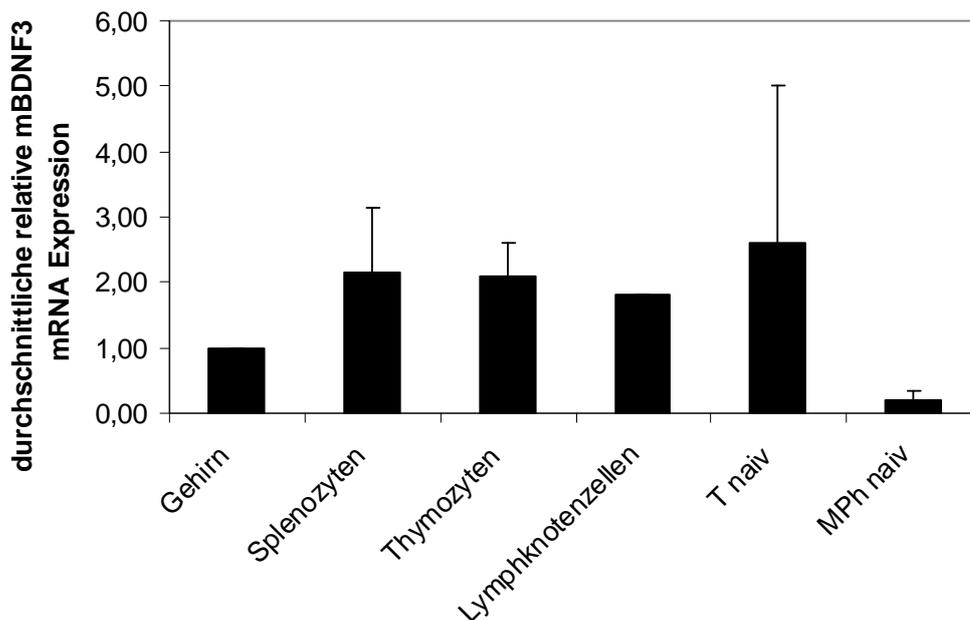
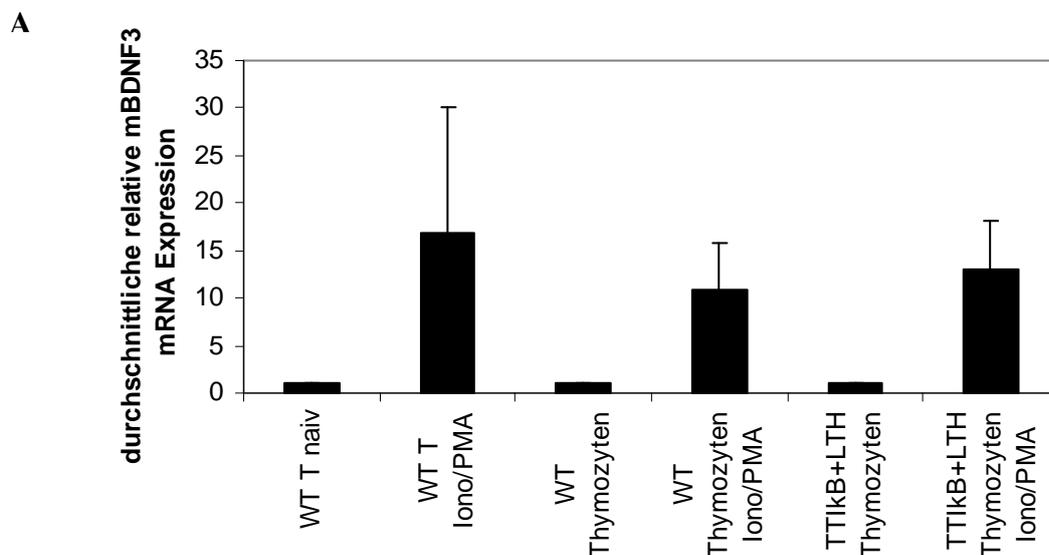


Abb. 4.3: Durchschnittliche relative Expression der mBDNF 3 mRNA in peripherem lymphatischem Gewebe und in Immunzellpopulationen von C57Bl/6 Mäusen. Die relative Expression wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode berechnet, wobei die mBDNF3 Expression im Gehirn als Kalibrator diente und auf 100 % gesetzt wurde. $n=1$ für Lymphknotenzellen, $n=3$ für alle anderen Proben. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

Weiterhin wurde berichtet, dass die Aktivierung von T-Zellen zu einer Erhöhung der BDNF Proteinexpression führt. Dies kann entweder an der quantitativen Erhöhung der detektierten mBDNF 3 mRNA Expression liegen oder an einer zusätzlichen Aktivierung anderer BDNF mRNA *Splice*-Varianten. Um eine dieser Erklärungsansätze zu bestätigen bzw. auszuschließen, wurden aus einer C57Bl/6 Maus Thymozyten und T-Zellen aus der Milz isoliert und mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die Analyse der BDNF mRNA *Splice*-Varianten ergab eine 10fache Erhöhung der mBDNF 3 mRNA Expression in Thymozyten und 17fache Erhöhung der Expression dieser *Splice*-Variante in T-Zellen aus der Milz (Abb. 4.4 A). Andere *Splice*-Varianten waren auch nach der Stimulation nicht detektierbar. Peritoneale Makrophagen wurden für 24 Stunden mit LPS stimuliert und zeigten anschließend ebenso nur die Expression von mBDNF 3 mRNA, die jedoch diesmal im Vergleich zu unbehandelten Makrophagen um ein 4faches reduziert war (Abb. 4.4 B). Um zudem zu untersuchen, welche Transkriptionsfaktoren bei der Hochregulierung von mBDNF 3 mRNA verantwortlich sein könnten, wurde ein tet induzierbares System verwendet, bei dem der Transkriptionsfaktor NF- κ B spezifisch in T-Zellen runterreguliert ist. Von diesen doppeltransgenen Tieren wurden Thymozyten entnommen und mit Wildtyp Thymozyten verglichen (Abb. 4.4 A). Dabei stellte sich heraus, dass die Expression von mBDNF 3 mRNA nach Stimulation der Thymozyten beider Genotypen vergleichbar war. Aus diesem Grund konnte eine entscheidende Rolle des Transkriptionsfaktor NF- κ B in der Regulation von mBDNF 3 in T-Zellen ausgeschlossen werden.



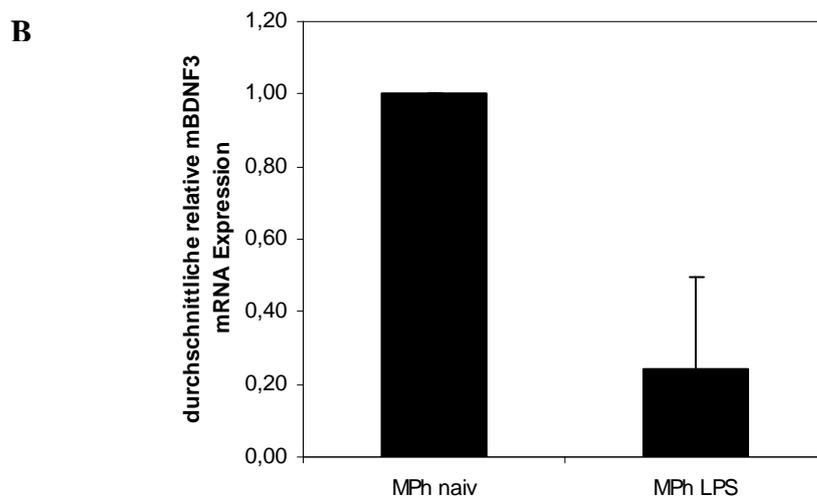


Abb. 4.4: Durchschnittliche relative Expression der mBDNF 3 mRNA. Die mBDNF mRNA Expression wurde in **A.** stimulierten und aufgereinigten T-Zellen und Thymozyten von Wildtyp C57Bl/6 Tieren, sowie in Thymozyten von C57Bl/6 Tieren, in denen der Transkriptionsfaktor NF κ B spezifisch in T-Zellen unterdrückt ist (TTI κ B+LTH) **B.** und in stimulierten Makrophagen von C57Bl/6 Tieren untersucht. Die relative Expression wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta$ CT Methode berechnet, wobei die mBDNF 3 Expression in **A.** unstimulierten T-Zellen oder **B.** unstimulierten Makrophagen als Kalibrator diente und auf 100 % gesetzt wurde. **A.** n=4 für Wildtyp Thymozyten, n=2 für aufgereinigte T-Zellen und n=2 für TTI κ B+LTH Thymozyten. **B.** n=3. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

Um auszuschließen, dass die erzielten Ergebnisse nur für den C57Bl/6N Mausstamm gelten, wurden auch weitere Zuchtstämme mit anderen MHC Haplotypen (Balb/c-MHC^d und FVB/N-MHC^q) in die Versuche mit einbezogen. Die Analyse der beiden Stämme resultierte in vergleichbaren Ergebnissen, die die Expressionsrate der BDNF mRNA *Splice*-Variante im Gehirn und speziell die Expression von mBDNF 3 mRNA in T-Zellen und Makrophagen betreffen.

Demnach kann man zusammenfassen, dass in peripheren murinen lymphatischen Organen und isolierten T-Zellen sowie Makrophagen nur die mRNA der *Splice*-Variante mBDNF 3 exprimiert wird, und dass die Stimulation von T-Zellen zu einer Erhöhung der mBDNF 3 mRNA Expression führt, jedoch nicht zur Expression weiterer *Splice*-Variante.

4.1.3 Expression und Quantifizierung der mBDNF mRNA *Splice*-Varianten in Mikroglia und Astrozyten

Mikroglia und Astrozyten spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese und im Erkrankungsverlauf der EAE und MS. Zudem sind Mikroglia und Makrophagen nah miteinander verwandt und teilen gleiche Immunfunktionen sowie Oberflächenmoleküle, was die Untersuchung der mBDNF *Splice*-Varianten in diesen Zelltypen sehr attraktiv machte.

Beide Zelltypen wurden dafür aus einer gemischten Gliazellkultur aus dem Gehirn von Neugeborenen C57Bl/6N Mäusen gewonnen. Nach der Aufarbeitung wurden routinemäßig Mikrogliaulturen von 97 %-iger Reinheit gewonnen, die nur wenig Astrozytenkontaminationen enthielten.

Die Analyse der mBDNF *Splice*-Varianten ergab, dass in Astrozyten alle *Splice*-Varianten exprimiert werden, und dass die Expressionsrate von mBDNF mRNA 1, 4, 6A und 6B vergleichbar mit dem im Gehirn ist (Abb. 4.5). Ganz deutlich war eine Überrepräsentation von mBDNF 5 mRNA erkennbar, dessen relative mRNA Expression 5fach höher war als die Expression der mBDNF 1 mRNA. Die relative mBDNF 3 mRNA Expression hingegen war im Vergleich zur Expression im Gehirn doppelt so hoch und erreichte circa 4 % der Expression von mBDNF 1 mRNA. Im Fall der Mikroglia konnte nur die mRNA der *Splice*-Variante mBDNF 3 detektiert werden (Abb. 4.7.).

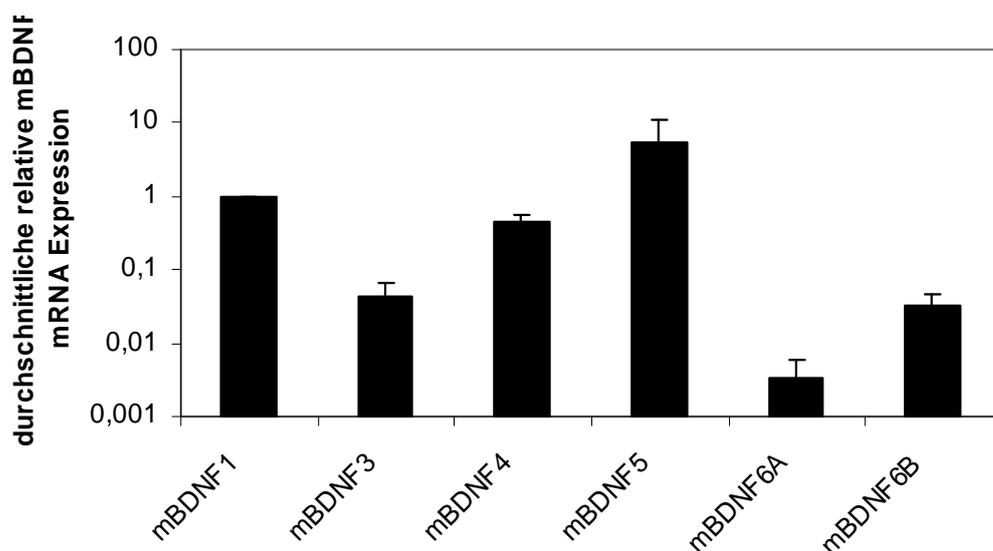


Abb. 4.5: Durchschnittliche relative Expression der mBDNF mRNA *Splice*-Varianten in Astrozyten von C57Bl/6 Mäusen. Die relative mBDNF mRNA Expression in Astrozyten wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode berechnet, wobei die mBDNF 1 Expression als Kalibrator diente und auf 100 % gesetzt wurde. $n=3$. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

Um die relative mRNA Expression der unterschiedlichen *Splice*-Varianten in Astrozyten und Mikroglia mit der Expression im Gesamthirn zu vergleichen, wurde die Expression der jeweiligen *Splice*-Variante im Gehirn auf 100 % gesetzt und die übrigen damit verglichen (Abb. 4.6).

Im Fall der Astrozyten war die mRNA Expression von mBDNF 5 in ähnlich hoher Menge exprimiert wie im Gehirn. Im Gegensatz dazu, erreichte die relative mRNA Expression von mBDNF 3 und 6A nur circa 10 % der Expression im Gehirn. Die Expression von mBDNF 1 und 4 mRNA war in Astrozyten noch geringerer und erreichte nur 1-5 % der Expression im Gehirn (Abb. 4.6). In Mikroglia lag die Expression von mBDNF 3 bei nur circa 15 % von der im Gehirn beobachteten Expression (Abb. 4.7).

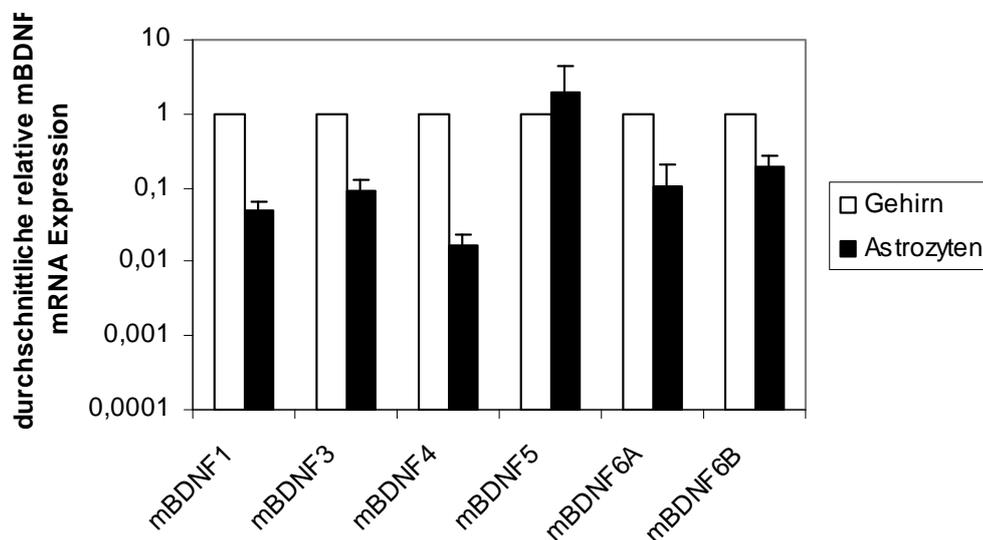


Abb. 4.6: Durchschnittliche relative Expression der mBDNF mRNA *Splice*-Varianten in Astrozyten im Vergleich zum Gesamthirn von C57Bl/6 Mäusen. Die relative mBDNF mRNA Expression in Astrozyten wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta CT$ Methode berechnet, wobei die Expression der entsprechenden mBDNF *Splice*-Variante aus dem Gesamthirn als Kalibrator diente und auf 100 % gesetzt wurde. n=2. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

Diese Ergebnisse zeigten, dass in Astrozyten zwar mBDNF 5 im Vergleich zum Gesamtgehirn überrepräsentiert ist, aber dass diese nicht die einzige *Splice*-Variante ist, während in Mikroglia nur mBDNF 3 exprimiert wurde, was vergleichbar mit peritonealen Makrophagen ist (Abb. 4.7).

Die Stimulation der Mikroglia und Astrozyten mit LPS bzw. IFN- γ zeigte keine signifikante Veränderung der Expression der mBDNF *Splice*-Varianten in Astrozyten, während die

mBDNF 3 mRNA Expression nach Stimulation der Mikroglia mit LPS um die Hälfte reduziert war (Abb. 4.7), was vergleichbar war mit den Ergebnissen, die für peritoneale Makrophagen erzielt wurden.

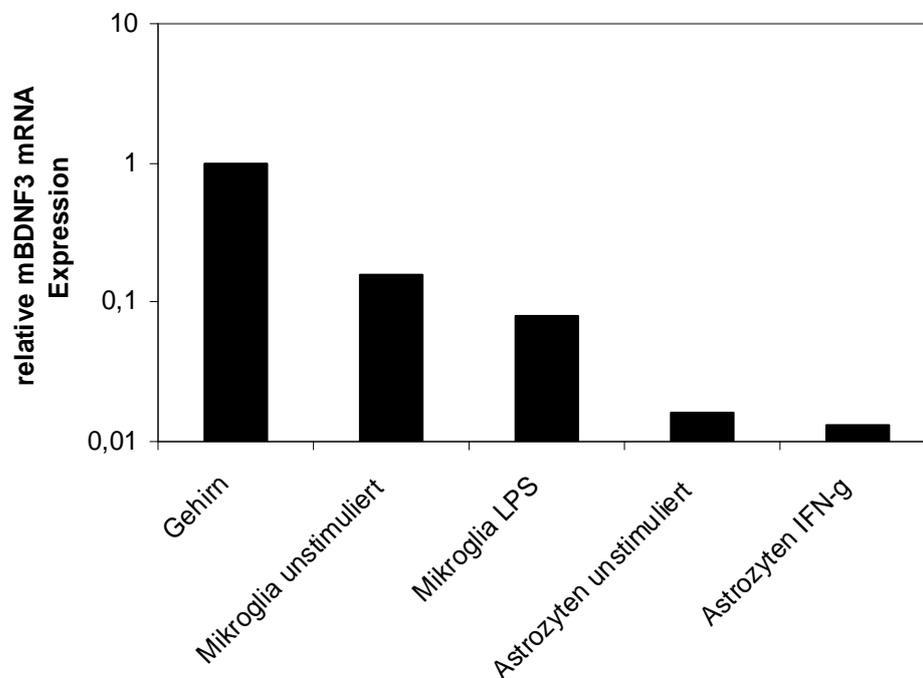


Abb. 4.7: Durchschnittliche relative Expression der mBDNF 3 mRNA *Splice*-Varianten in gereinigten Astrozyten und Mikroglia von C57Bl/6 Mäusen. Die relative mBDNF 3 mRNA Expression in unstimulierten und stimulierten Mikroglia und Astrozyten wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode berechnet, wobei die mBDNF 3 Expression im Gesamthirn als Kalibrator diente und auf 100 % gesetzt wurde. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

4.2 BDNF und dessen funktionelle Relevanz in der EAE

BDNF ist ein Mitglied der Neurotrophinfamilie und spielt eine Schlüsselrolle im neuronalen Überleben sowie deren Differenzierung und Plastizität (Lewin and Barde, 1996). Zudem konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass dieses Neurotrophin axonprotektive Eigenschaften besitzt (Gravel et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; McTigue et al., 1998; Sendtner et al., 1992; Yan et al., 1992). Zwar bilden Neuronen die Hauptquelle für BDNF, aber auch Immunzellen können bioaktives BDNF exprimieren (Kerschensteiner et al., 1999). Diese BDNF-exprimierenden Immunzellen wurden auch in entzündlichen Läsionen im ZNS von MS-Patienten detektiert, was zu der Annahme geführt hat, dass infiltrierende Immunzellen nicht nur destruktive sondern durch die BDNF Expression auch neuroprotektive Eigenschaften besitzen könnten (Stadelmann et al., 2002). Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Applikation von BDNF in einem Mausmodell der Motorneuronendegeneration erfolgreiche Therapieergebnisse brachte (Mitsumoto et al., 1994). Die exogene Applikation von freiem BDNF in einem Modell der experimentellen autoimmunen Neuritis war jedoch nicht sehr effizient (Felts et al., 2002). Um den potenziell benefiziellen Effekt des BDNF in der EAE, dem Tiermodell der MS, zu untersuchen, wurde ein lentivirales Transduktionssystem gewählt, in das die BDNF Gensequenz inkloniert wurde. Mit Hilfe dieses Transduktionssystems sollte eine BDNF Überexpression in den Zielzellen erzeugt werden, um die Funktion des BDNF zu verstärken. Als geeignete Vehikel für den BDNF Transport wurden MOG T-Zellrezeptortransgene und GFP positive T-Zellen ausgewählt. Diese boten den Vorteil, dass das BDNF die Möglichkeit bekam mit Hilfe der T-Zellen in das ZNS einzudringen, um die Läsionen zu erreichen, in denen es durch die Überexpression seine potenziell therapeutische Funktion ausüben konnte. Das GFP Transgen sollte die Detektion der applizierten T-Zellen *in vivo* vereinfachen.

Hier eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus:

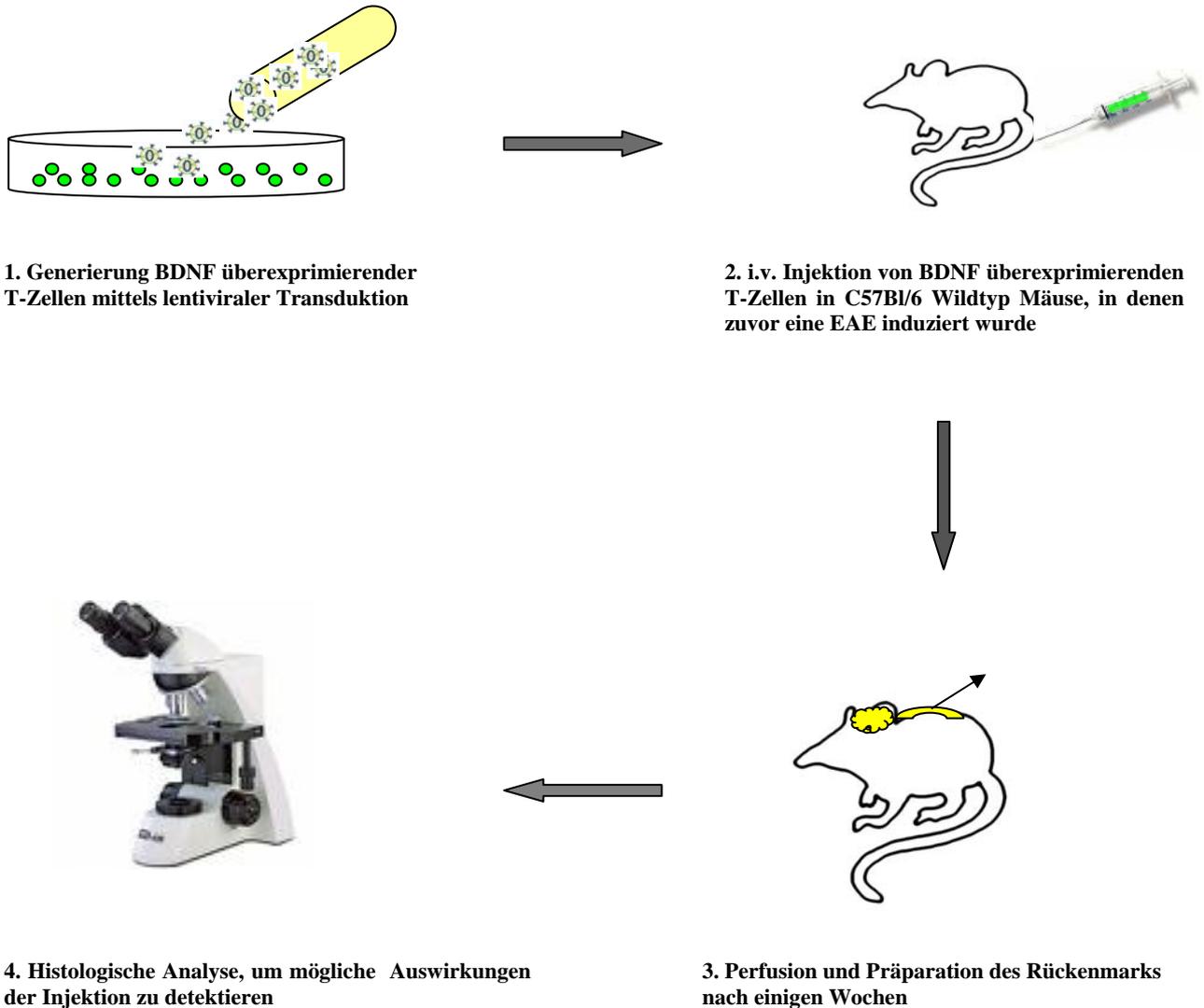


Abb. 4.8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Diese schematische Darstellung zeigt den Versuchsaufbau für die funktionellen Untersuchungen der Überexpression des BDNF in T-Zellen *in vivo*.

4.2.1 Generierung BDNF überexprimierender T-Zellen mittels lentiviraler Transduktion

Um BDNF überexprimierende T-Zellen zu generieren wurde das lentivirale Transduktionssystem verwendet, da Lentiviren die Fähigkeit haben das zu transferierende

Gen in das Wirtsgenom stabil zu integrieren und vor allem auch ruhende Zellen zu infizieren. Somit wäre eine Aktivierung der T-Zellen vor der Infektion nicht notwendig und ein eventuell negativer Einfluss der zusätzlichen Aktivierung auf die EAE wäre ausgeschlossen. Ein weiterer Grund für die Wahl der lentiviralen Transduktion für die BDNF Überexpression war, dass T-Zellen resistent gegen andere Transfermöglichkeiten der DNA sind. So war es bisher nicht möglich T-Zellen z.B. mittels Lipofektion (siehe Kap. 3.2.11) zu transfizieren.

Um einen BDNF-codierenden lentiviralen Vektor zu generieren, wurde ein lentiviraler Ausgangsvektor verwendet, der von Prof. Harald Neumann (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt wurde und pLenti-PGK-EGFP heißt. Dieser Vektor besitzt einen Phosphoglyceratkinase (PGK) Promoter, der die konstitutive Expression des nachfolgenden Gens befähigt. Die EGFP-Sequenz im Vektor, die direkt an die Promotersequenz angrenzt, wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI durch die murine BDNF-Sequenz ersetzt (Abb. 4.9).

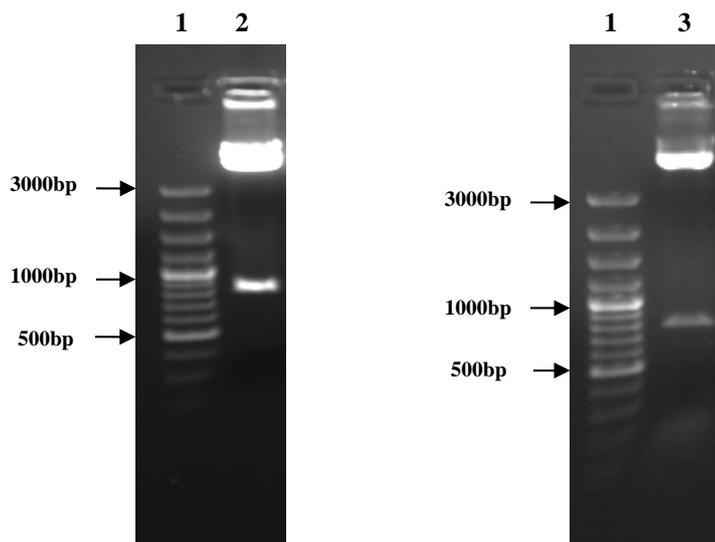


Abb. 4.9: Restriktionsverdau lentiviraler Vektoren. Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung des Restriktionsverdaus. 1) Generuler 100pb plus, Fermentas 2) plenti-PGK-EGFP verdaut mit BamHI und XhoI, erwartete Fragmentgröße Vektor = 6859 bp und Insert = 724bp 3) plenti-PGK-BDNF verdaut mit BamHI und XhoI, erwartete Fragmentgröße Vektor = 6850 bp und Insert = 750 bp.

Um die Klonierungseffizienz und die Expression des BDNF in dem neuen Vektor zu testen, wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK) mit diesem lentiviralen Vektor transfiziert. Der Überstand dieser Zellkultur wurde in einem BDNF-ELISA getestet und zeigte, dass bei

einer Transfektion mit 3 μg DNA, mehr als 2 ng/ml des BDNF Proteins in den Überstand sezerniert wurde, während die Expression dieses Proteins in nicht-transfizierten bzw. nur mit dem Transfektionsreagenz (Nanofectin) transfizierten Zellen mit nur 78 pg/ml im Überstand zu detektieren war (Abb. 4.10 A). Dieses Ergebnis zeigte, dass das murine BDNF Gen in den lentiviralen Vektor richtig einkloniert wurde und, dass das BDNF Protein exprimiert werden konnte.

Nachdem die Funktionalität des Vektors geklärt war, wurde der Vektor zur Generierung des Lentivirus verwendet. Der Lentivirus wurde zunächst an HEK-Zellen getestet. Um zu überprüfen, ob die Transduktionseffizienz durch Polybrene, einem kationischen Polymer, gesteigert wird, wurde zusätzlich jeweils einem Ansatz dieses Reagenz hinzugefügt. Die Analyse der HEK-Zellen erfolgte auf Proteinebene und da das Virus mindestens 3 Tage benötigt bis es das Zielgen exprimiert wurden speziell die Tage 4 bis 6 nach der Infektion beobachtet. Der BDNF-ELISA zeigte, dass die infizierten Zellen mehr BDNF Protein exprimieren als die unbehandelten Zellen (Abb. 4.10 B). Die Expressionsrate lag nach 4 Tagen bei den Ansätzen ohne Polybrenebehandlung bei circa 30 pg/ml und stieg an Tag 6 bis auf 93 pg/ml auf. Der Vergleich zu den Ansätzen mit Polybrenebehandlung zeigte geringere BDNF-Proteinkonzentrationen im Überstand, woraus sich schließen ließ, dass Polybrene im Fall der Transduktion von HEK-Zellen nicht besonders effizient ist. Der Lentivirus war aber in HEK-Zellen funktionell und führt zu einer Überexpression des BDNF nach Transduktion.

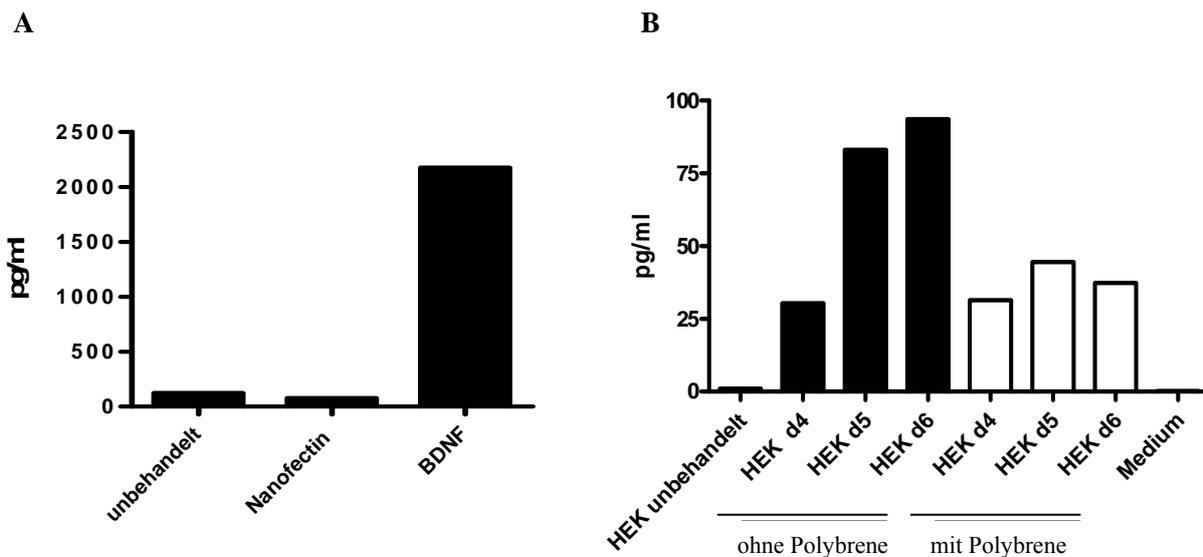


Abb. 4.10: Austestung des lentiviralen BDNF Vektors sowie des BDNF Virus an HEK-Zellen. BDNF Expression detektiert im Überstand der Zellkultur mittels BDNF ELISA nach **A**. Transfektion von HEK-Zellen mit dem lentiviralen BDNF Vektor und **B**. nach Transduktion von HEK-Zellen mit dem BDNF Lentivirus.

Um tatsächlich BDNF-überexprimierende T-Zellen zu erhalten, wurden anfangs primäre, naive T-Zellen verwendet. Dieser Ansatz stellte sich jedoch für die *in vitro* Experimente als nicht durchführbar heraus, da primäre T-Zellen nicht länger als 3 Tage in Kultur zu halten sind, auch wenn sie relativ stark stimuliert werden. Da aber die Effizienz der Transduktion erst nach frühestens 4 Tagen zu detektieren ist, konnten primäre T-Zellen für die *in vitro* Versuche nicht verwendet werden. Aus diesem Grund wurde das Virus an einer MOG-spezifischen T-Zelllinie, die aus C57BL/6 Mäusen gewonnen wurden, getestet (Abb. 4.11). Auch hier wurden die Tage 3–6 näher betrachtet und die Transduktion auf mRNA und Proteinebene analysiert. Auf mRNA-Ebene war ein Anstieg des BDNF im Laufe der beobachteten 3 Tage zu detektieren. Zur quantitativen Analyse des Anstiegs wurden die Expression der BDNF mRNA in den unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt und die relative Expression der infizierten Zellen dazu ermittelt. Das Ergebnis zeigte, dass die infizierten Zellen an Tag 6 circa 60-mal mehr BDNF mRNA exprimieren als die unbehandelten Zellen. Die Analyse der BDNF Proteinexpression wurde mit Hilfe eines BDNF-ELISAs durchgeführt und zeigte im Fall der Proben ohne die Zugabe von Polybrene eine sehr geringe BDNF-Konzentration im Überstand, die sich im Laufe der 3 Tage kaum erhöhte. Während die Proben, die mit Polybrene behandelt wurden einen Anstieg der BDNF-Konzentration im Überstand zeigten, der an Tag 5 eine Konzentration von circa 26 pg/ml erreichte. Diese Analysen zeigen, dass nicht nur der lentivirale Vektor funktionell ist, sondern auch das daraus generierte Lentivirus sowohl HEK- als auch T-Zellen infizieren kann und zu einer BDNF Überexpression führt.

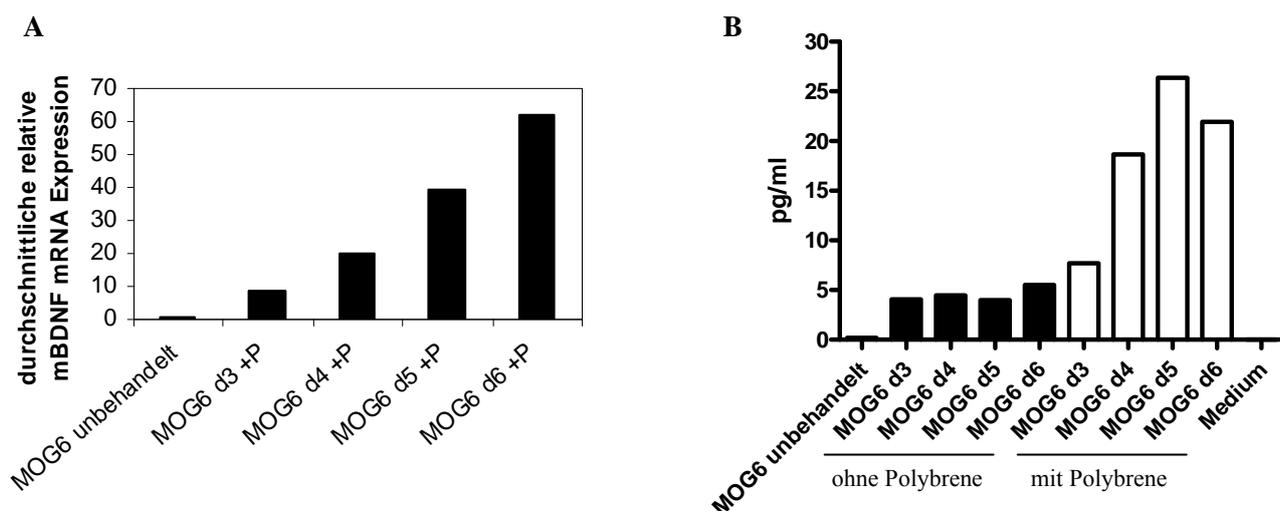


Abb. 4.11: Lentivirale Transduktion von T-Zellen einer MOG-spezifischen Zelllinie. BDNF Expression in MOG-spezifischen T-Zellen einer Zelllinie nach lentiviraler Transduktion mit dem BDNF Lentivirus detektiert **A.** im Überstand der T-Zellkultur mittels BDNF-ELISA und **B.** auf mRNA Ebene mittels Real-Time PCR.

Um auszuschließen, dass die Virusinfektion an sich eine erhöhte BDNF-Expression verursacht und um in den *in vivo* Experimenten eine adäquate Kontrolle zu besitzen, wurde ein Kontrollvirus mit Hilfe des pLenti-PGK-EGFP Originalvektors generiert. Die Funktionalität dieses Virus wurde auch an HEK- und T-Zellen getestet, die in Fluoreszenzmikroskopischen Analysen stets nach Infektion mit dem Kontrollvirus eine grüne Fluoreszenz aufzeigten und somit das Virus als funktionell bestätigten (Abb. 4.12). Der Überstand der GFP-Virus infizierten T-Zellen wurde auf BDNF Proteinexpression hin untersucht, mit dem Ergebnis, dass keine detektierbare Konzentration des BDNF Proteins im ELISA nachgewiesen werden konnte. Damit wurde eine Erhöhung der BDNF-Expression allein durch eine Virusinfektion ausgeschlossen.

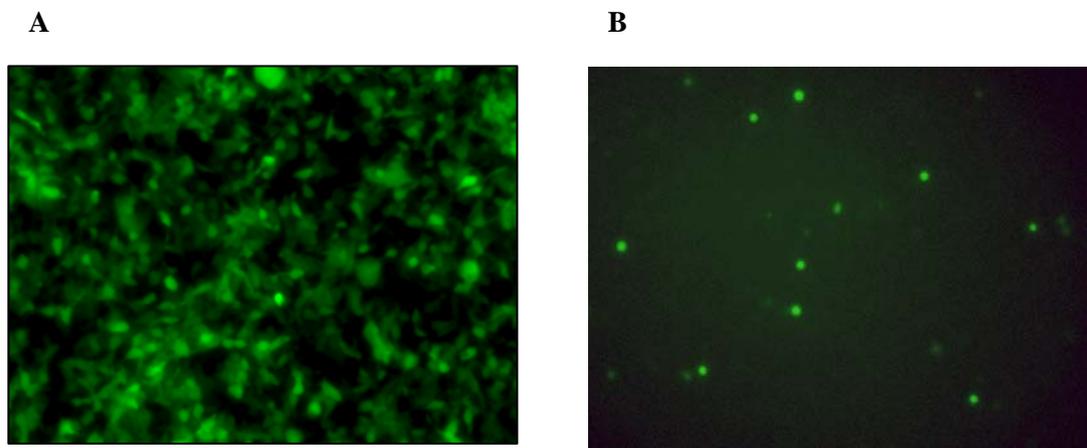


Abb. 4.12: Lentivirale Transduktion mit dem GFP Virus. Fluoreszenzmikroskopische Analyse nach GFP Virusinfektion von **A.** HEK-Zellen und **B.** MOG-spezifischen T-Zellen einer Zelllinie. Die Aufnahmen wurden mit einem 20x Objektiv angefertigt.

Als nächstes sollte die Expression von BDNF in transduzierten T-Zellen nach *i.v.* Applikation nachgewiesen werden. Dafür wurden GFP positive T-Zellen aus einer GFP transgenen Maus isoliert. Für jedes Empfängertier wurden 10×10^6 T-Zellen aufgereinigt und mit dem BDNF Lentivirus transduziert. Die Zellen wurden für die *i.v.* Injektion in je 200 μ l PBS pro Tier aufgenommen und *i.v.* in die Schwanzvene der C57Bl/6 Empfängertiere appliziert. 21 Tage nach *i.v.* Applikation wurden die lentiviral mit BDNF transduzierten GFP positiven T-Zellen aus der Milz der Empfängertiere mittels FACS nach GFP Fluoreszenz sortiert und durch Cytospin (1200 rpm, 10 Minuten) auf Objektträger aufgebracht. Nach immunhistochemischer Färbung für BDNF wurde eine deutlich intensivere Färbung im Fall der mit BDNF transduzierten T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp T-Zellen nachweisbar (Abb. 4.13). Um zu

zeigen, dass die aus der Milz der Empfängertiere sortierten und auf Objektträger gebrachten Zellen auch GFP positiv sind, wurden diese fluoreszenzmikroskopisch untersucht und zeigten die erwartete grüne Fluoreszenz. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass nach lentiviraler Transduktion mit dem BDNF Virus mehr BDNF exprimiert wird als in unbehandelten T-Zellen und dass diese BDNF-Überexpression auch noch längere Zeit *in vivo* anhält.

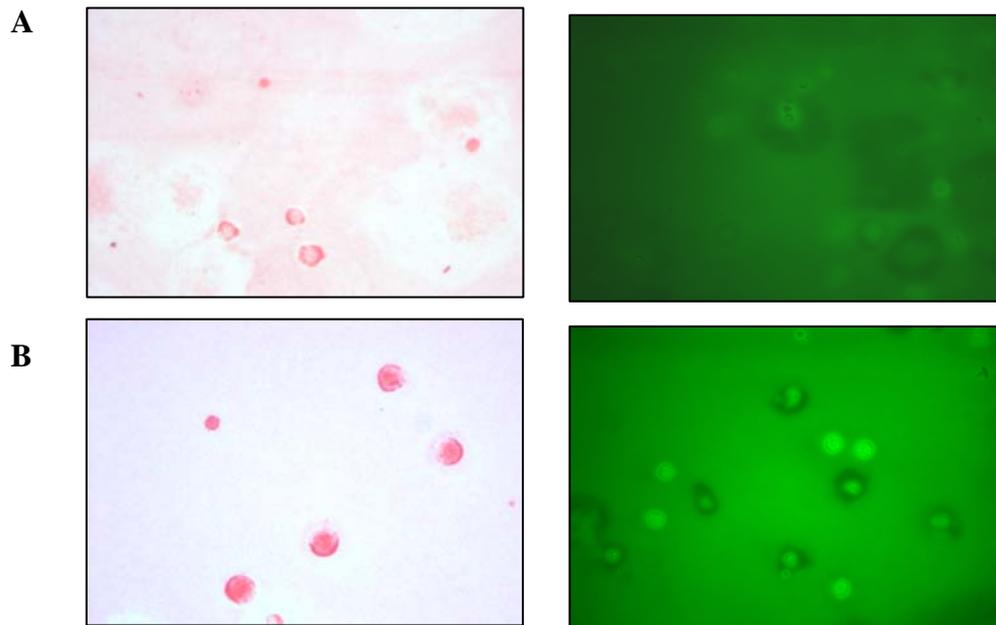


Abb. 4.13: BDNF Cytopins unbehandelter und lentiviral transduzierter T-Zellen. Immunohistochemische Färbung von T-Zell Cytopins mit BDNF, sowie fluoreszenzmikroskopische Analysen der GFP Expression von **A.** unbehandelten T-Zellen einer C57BL/6 Maus und **B.** mit dem BDNF Lentivirus transfizierten GFP positive T-Zellen nach 22 Tagen der i.v. Applikation in C57BL/6 Mäusen. Die Aufnahmen wurden mit einem 40x Objektiv angefertigt.

4.2.2 Testen des codierenden BDNF Proteins auf Bioaktivität

Die vorangegangenen Experimente zeigten zwar, dass das murine BDNF Gen korrekt inkloniert und auch, dass das BDNF Protein exprimiert wurde. Jedoch bestätigte dies nicht, dass das BDNF Protein auch tatsächlich bioaktiv war. Um das zu überprüfen wurde ein BDNF Bioassay mit den Überständen des BDNF Virus und mit Hilfe von Prof. Stefan Wiese (Universität Bochum) durchgeführt. Dabei wurde von der Eigenschaft der murinen dorsalen

Wurzelganglien Gebrauch gemacht, dass diese ohne das BDNF Protein nicht in der Lage sind zu überleben. Falls nun bioaktives BDNF in den Virusüberständen vorhanden sein sollte, so sollten die Ganglien, denen der Überstand zugegeben wurde, überleben. Das Ergebnis zeigte auf signifikante Art und Weise (** $p < 0,01$), dass nach Zugabe einer 1:1000 Verdünnung des BDNF-Virusüberstandes circa 9 % der Ausgangszellen überlebt haben (Abb. 4.14). Zudem zeigte der ELISA, indem der Gehalt des BDNF Proteins in diesen Überständen getestet bei einer Verdünnung von 1:1000 eine Konzentration von 300 pg/ml. Wenn man nun die Überlebensrate der getesteten Ganglien mit denen der Kontrolle vergleicht, so sollte die BDNF Proteinkonzentration der getesteten Probe zwischen 0,1-1 ng/ml sein, was auch dem im ELISA gemessenen Wert entspricht. In der 1:10.000 Verdünnung des Virusüberstandes hingegen scheint die BDNF Konzentration so stark herunterverdünnt zu sein, dass es zum Überleben der Ganglien nicht mehr ausgereicht hat. Als Kontrolle wurde der Überstand des GFP Virus mit der gleichen Verdünnung (1:1000) in den Überlebensassay eingesetzt und erzielte nur eine sehr geringe Überlebensrate vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle. Dadurch konnten unspezifische Effekte der Virusüberstände ausgeschlossen werden, die zum Überleben der Ganglien geführt haben könnten.

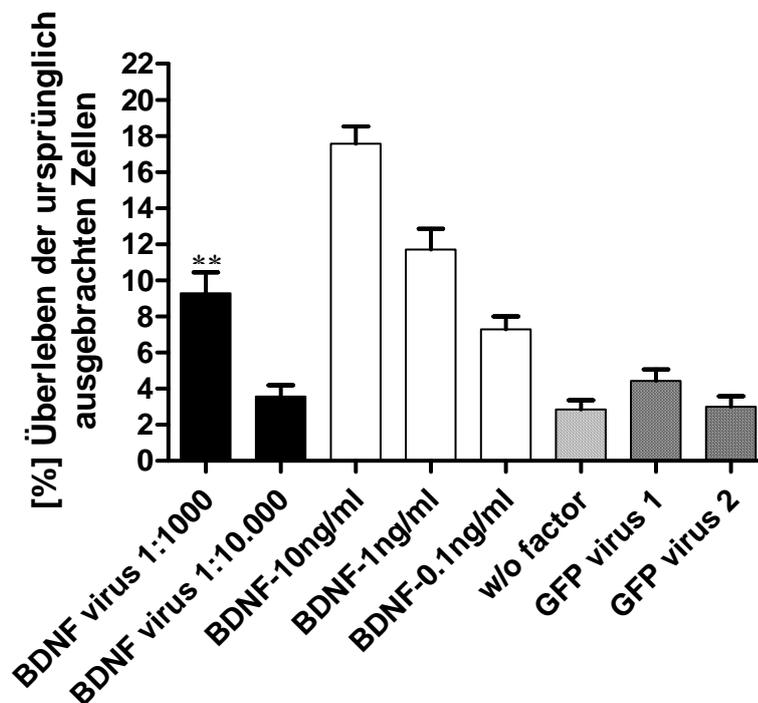


Abb. 4.14: BDNF Bioaktivitätstest mittels Überlebensassay mit murinen dorsalen Wurzelganglien. Überlebensrate der Ganglien nach Applikation von unterschiedlichen Verdünnungen der BDNF bzw. GFP Virusüberstände, sowie verschiedene Konzentrationen des BDNF Proteins (dienen als Standard) und eine unbehandelte Probe. n=7. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. (**p<0,01).

4.2.3 Testen der Überlebensrate i.v. injizierter T-Zellen *in vivo*

Nach erfolgreicher Generierung der BDNF-überexprimierenden T-Zellen, sollte das Überleben dieser T-Zellen nach i.v. Injektion *in vivo* untersucht werden. Dafür wurden T-Zellen aus einer GFP transgenen Maus isoliert. Der Einsatz von GFP positiven Zellen sollte zur besseren Detektion in einer C57BL/6 Wildtyp Maus dienen. Ein Teil dieser isolierten Zellen wurde wieder unbehandelt in C57BL/6 Wildtyp Mäuse i.v. injiziert, während der andere Teil mit dem BDNF Virus infiziert wurde. Diese beiden Bedingungen sollten dabei helfen, festzustellen, ob die Virusinfektion einen Einfluss auf das Überleben der injizierten T-Zellen hat und ob die Überlebensdauer injizierter Zellen lange genug ist, um spätere therapeutische Behandlungen durchführen zu können. Pro Tier wurden je 10×10^6 Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen und in C57Bl/6 Empfängermäuse i.v. in die Schwanzvene injiziert. Die Mäuse wurden ohne weitere Behandlung 14 bzw. 21 Tage im Versuch gehalten bis Ihnen zur Auswertung die Milzen entnommen wurden. Nach den Einzelzellsuspensionen wurden die Zellen ohne weitere Färbung im Durchflusszytometer nach GFP positiven Zellen untersucht. Die Auswertung ergab, dass nach 14 aber auch nach 21 Tagen noch GFP positive Zellen detektierbar waren, und dass die Virusinfektion keinen Nachteil auf das Überleben der T-Zellen ausübt (Abb. 4.15). Um die erzielten Daten zu stützen wurde dieser Ansatz wiederholt und zeigte vergleichbare Ergebnisse, die im Folgenden zusammengefasst sind. Von den injizierten 10×10^6 T-Zellen konnten nach 14 Tagen noch im Fall der unbehandelten T-Zellen $1,8 \times 10^5$ ($\pm 1,8$) GFP positive Zellen und im Fall der BDNF virusinfizierten T-Zellen noch $2,6 \times 10^5$ ($\pm 1,1$) GFP positive Zellen in der Milz detektiert werden. Nach 21 Tagen waren in den Milzen der Tiere, denen die unbehandelten T-Zellen gespritzt wurden noch $3,3 \times 10^5$ ($\pm 1,0$) GFP positive Zellen und in den Milzen der mit den virusinfizierten T-Zellen behandelten Tiere noch $2,3 \times 10^5$ ($\pm 0,9$) GFP positive Zellen detektierbar.

Aus diesem Versuchsansatz lässt sich zusammenfassen, dass injizierte T-Zellen mindestens 21 Tage *in vivo* überleben und in der Milz nachweisbar sind. Dies ist ein ausreichender Zeitraum für die nachfolgenden Therapieversuche durch die i.v. Injektion der transduzierten

T-Zellen. Zusätzlich war zu erkennen, dass die Virusinfektion keinen negativen Einfluss auf das Überleben der injizierten T-Zellen darstellte und somit keine weiteren Vorkehrungen für das vermehrte Überleben der T-Zellen getroffen werden mussten.

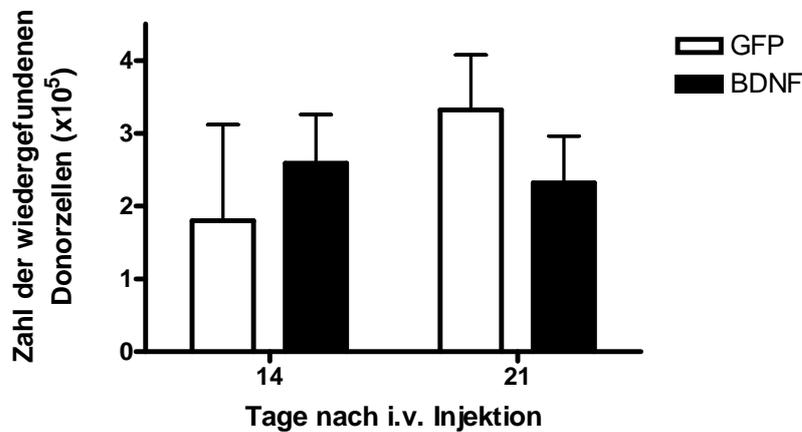


Abb. 4.15: Detektion der GFP positiven T-Zellen in der Peripherie nach i.v. Injektion in C57BL/6 Mäusen. GFP positive T-Zellen einer GFP transgenen Maus wurden entweder unbehandelt (weißer Balken) bzw. nach Infektion mit dem BDNF Virus (schwarzer Balken) in C57BL/6 Mäuse i.v. injiziert und nach 14 bzw. 21 Tagen die Milzen mittels FACS nach GFP positiven Zellen detektiert. n=2, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

4.2.4 Prüfung des Eintritts injizierter T-Zellen in das ZNS

Im vorangegangenen Abschnitt wurde zwar gezeigt, dass die injizierten T-Zellen in einer gesunden C57Bl/6 Maus mindestens 3 Wochen überleben, dennoch ist damit nicht bewiesen, dass die Zellen auch die Blut-Hirn-Schranke passieren und in das entzündete Gewebe des ZNS nach EAE Induktion gelangen, um dort einen Effekt auszuüben. Um zu untersuchen, ob T-Zellen tatsächlich das ZNS erreichen, wurden zunächst MOG-spezifische T-Zellen aus den Milzen der 2D2 T-Zellrezeptor transgenen Mäuse, die auch noch zusätzlich ein Transgen für GFP ubiquitär exprimieren, isoliert. Der Einsatz von MOG-spezifischen T-Zellen war von besonderer Bedeutung, da MOG das Antigen ist, welches in dem EAE-Modell dieser Arbeit angegriffen wird und dadurch die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die injizierten Zellen auch tatsächlich die Läsionen erreichen. Um dies zu überprüfen wurde in C57Bl/6 Mäusen eine MOG-EAE mit 50 µg MOG₃₅₋₅₅ und 50 µg CFA induziert und an Tag 2 und Tag 7 nach Immunisierung wurden MOG-spezifische T-Zellen den EAE induzierten Wildtyp Mäusen i.v.

injiziert. Die unterschiedlichen Zeitpunkte wurden bewusst gewählt, um den Zeitpunkt der optimalen Injektionszeit einzugrenzen. 15 Tage nach Immunisierung wurden die Tiere mit Paraformaldehyd perfundiert und histologisch bzw. mit dem Durchflusszytometer nach GFP positiven Zellen hin untersucht. Die Auswertungen der GFP Immunhistochemie zeigten, dass nur im Fall der an Tag 7 injizierten MOG-spezifischen T-Zellen eine positive Färbung vorzufinden war (Abb. 4.16 A). Auch im Durchflusszytometer konnte nach Lymphozytenisolation aus dem Rückenmark und nach zusätzlicher CD4 Färbung (spezifisch für T-Zellen) eine deutliche CD4/GFP doppelt positive Zellpopulation detektiert werden (Abb. 4.16 B). Die Mäuse, denen an Tag 2 die MOG-spezifischen T-Zellen injiziert wurden zeigten in der Immunhistologie keinerlei GFP positive Färbung und im Durchflusszytometer konnten lediglich 0,1 % GFP positive Zellen in der aus dem Rückenmark gewonnenen Lymphozytenpopulation wiedergefunden werden (Daten nicht abgebildet).

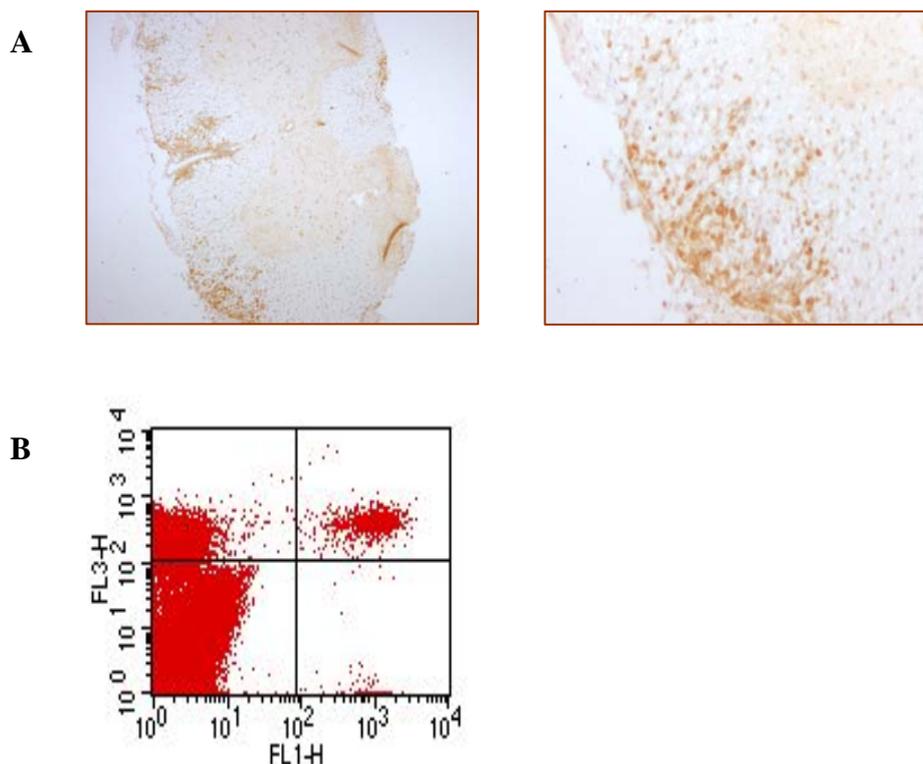


Abb. 4.16: Nachweis der GFP positiven T-Zellen im ZNS nach i.v. Injektion in C57BL/6 Mäusen. In C57Bl/6 Tiere wurde eine MOG-EAE induziert und an Tag 7 MOG-spezifische und GFP positive T-Zellen i.v. injiziert. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte an Tag 15 nach Immunisierung. **A.** Immunhistochemischer Nachweis der GFP positiven T-Zellen in Rückenmarksschnitten. Die Aufnahmen wurden mit einem 20x bzw. 40x Objektiv angefertigt. **B.** FACS Auswertung der Lymphozyten isoliert aus dem Rückenmark und untersucht nach GFP Fluoreszenz (FL1-H) und CD4 positiven Zellen (FL3-H) nach zusätzlicher Färbung.

Um zu untersuchen, ob auch GFP positive T-Zellen allein aus einer GFP transgenen Maus ohne einen MOG transgenen T-Zellrezeptor das ZNS nach Immunisierung erreichen würden, wurden C57Bl/6 Tiere mit 50 µg MOG₃₅₋₅₅ und 50 µg CFA immunisiert und da sich die i.v. Injektion an Tag 7 als effektivste Injektionszeit darstellte, wurden den Empfängertieren je 10 Millionen GFP positive T-Zellen 7 Tage nach Immunisierung i.v. injiziert. Die Tiere wurden an Tag 19 perfundiert und immunhistochemische Untersuchungen zeigten keinerlei positive GFP Färbung im Rückenmark. Dieses Ergebnis unterstützte die Bedeutung des Einsatzes der MOG-spezifischen GFP positiven T-Zellen in diesem Versuchsvorhaben.

Um auszuschließen, dass MOG-spezifische T-Zellen aus der T-Zellrezeptor transgenen Maus nach Transfer und ohne Immunisierung mit MOG eine EAE auslösen, was einen negativen Effekt auf den Versuchsaufbau hätte, wurden ca. 10 Millionen T-Zellen aus diesen transgenen Tieren in C57Bl/6 Empfängertiere i.v. injiziert. Die Tiere wurden ohne weitere Behandlung 21 Tage im Versuch gehalten. Unter normalen Bedingungen treten die ersten Symptome einer EAE nach aktiver Immunisierung mit MOG nach ca. 8-10 Tagen auf. In diesem Ansatz wurden jedoch auch nach 21 Tagen nach i.v. Injektion keinerlei Anzeichen einer EAE beobachtet. Auch immunhistochemische Untersuchungen zeigten keine Infiltration von T-Zellen und Makrophagen im ZNS.

Dies lässt schlussfolgern, dass MOG-spezifische T-Zellen aus den T-Zellrezeptor transgenen Mäusen unter diesen Bedingungen selbst nicht in der Lage sind eine EAE auszulösen.

4.2.5 Einfluss der BDNF überexprimierenden T-Zellen auf die MOG₃₅₋₅₅-EAE

Nach Abschluss der Voruntersuchungen, die zeigten, dass nach lentiviraler Transduktion MOG-spezifische T-Zellen aus den T-Zellrezeptor transgenen Mäusen vermehrt bioaktives BDNF bzw. GFP exprimieren und dass diese mindestens 3 Wochen in der Milz der Empfängertiere und ebenso nach EAE Induktion im ZNS nachzuweisen sind konnten die eigentlichen funktionellen Untersuchungen starten. Dafür wurde in zwei voneinander unabhängigen Ansätzen in jeweils 18 C57Bl/6 Tieren eine MOG₃₅₋₅₅-EAE mit 50 µg MOG₃₅₋₅₅ und 50 µg CFA ausgelöst. Wie bereits festzustellen war stellte die Injektion an Tag 7 den effektivsten Zeitpunkt dar. Dafür wurden T-Zellen aus den Milzen von MOG-spezifischen T-Zellrezeptor-transgenen GFP positiven C57Bl/6 Tieren isoliert. Je 60 Millionen T-Zellen wurden entweder mit dem BDNF oder dem GFP Virus transduziert, daraus ergab sich, dass jeweils 6 Tiere mit je 10 Millionen BDNF bzw. GFP Virus

transduzierten MOG-spezifischen GFP positiven T-Zellen behandelt wurden. Die mit dem GFP Virus infizierten T-Zellen dienten als Kontrollgruppe, die einen eventuellen Einfluss der lentiviralen Transduktion selbst auf den Verlauf der EAE aufzeigen sollte. Eine dritte Kontrollgruppe bestehend aus weiteren 6 C57Bl/6 Tieren wurde lediglich mit PBS behandelt. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 22 Tagen nach Immunisierung täglich beobachtet und die Schwere der Erkrankung bewertet. Der Krankheitsbeginn fand in allen 3 Gruppen an Tag 12 statt und verlief in den beiden Kontrollgruppen (PBS und GFP Virus behandelt) schwerer als in der mit den BDNF transduzierten T-Zellen behandelten Mäuse (Abb. 4.17). Der klinische EAE-Verlauf der beiden Kontrollgruppen verlief sehr ähnlich. Der Krankheitsverlauf der PBS behandelten Gruppe fand seinen Höhepunkt an Tag 16 und ging dann in die chronische Phase über, während die Gruppe, die mit den GFP transduzierten T-Zellen behandelt wurde, seinen klinischen Höhepunkt an Tag 18 bei einem Score von ungefähr 6 fand und auch in die chronische Phase übergang. Der klinische EAE-Verlauf der BDNF behandelten Tiere hingegen verlief sehr viel milder und über die Dauer von 6 Tagen um bis zu 2 *Score*punkte vermindert. Der größte signifikante Unterschied (* $p < 0,05$) im klinischen Verlauf zwischen den Kontrollgruppen und der BDNF behandelten Tiere konnte an Tag 13 und 14 beobachtet werden. Dieser Effekt legte sich nach ca. 6 Tagen nach denen sich die EAE-Kurve der BDNF behandelten Tiere langsam dem Verlauf der Kontrollgruppen annäherte. Im Fall der PBS behandelten Tiere erreichte unsere BDNF behandelten Tiere auch tatsächlich dessen Grad an Erkrankung, während zur eigentlichen Kontrollgruppe, nämlich der mit den GFP behandelten T-Zellen, an Tag 22 immer noch ein Unterschied von einem *Score*punkt existierte. In den histologischen Untersuchungen wurden auch nur diese beiden Gruppen miteinander verglichen.

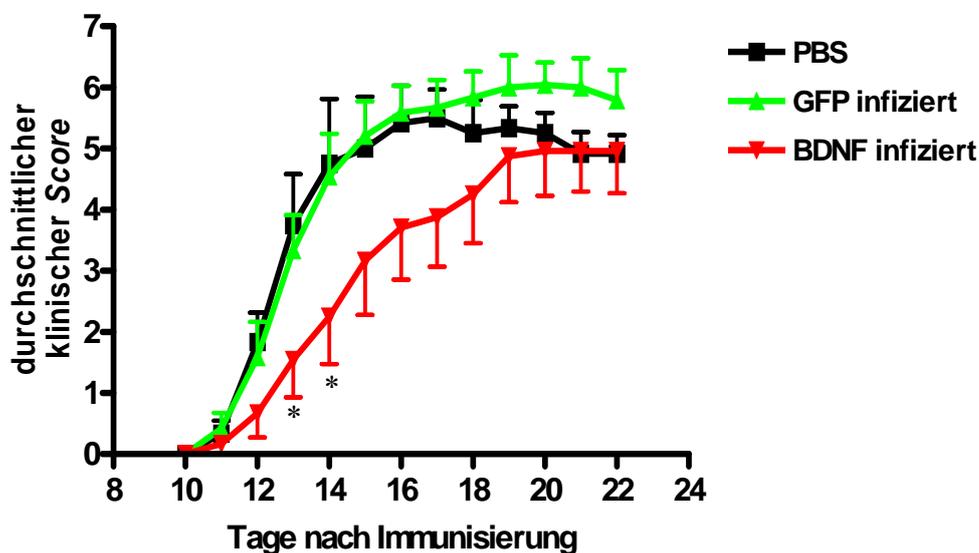


Abb. 4.17: EAE Krankheitsverlauf i.v. injizierter und mit MOG₃₅₋₅₅ immunisierter C57Bl/6 Mäuse. Tiere wurden an Tag 7 nach Immunisierung mit BDNF Virus transduzierten T-Zellen (rote Linie), GFP Virus transduzierten T-Zellen (grüne Linie) bzw. PBS (schwarze Linie) i.v. injiziert. Der Erkrankungszustand wurde täglich überprüft und der Versuch wurde an Tag 22 nach Immunisierung beendet. n=12 aus zwei unabhängigen Experimenten. (*p<0,05).

In den ersten immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Rückenmarksschnitte der mit GFP und BDNF behandelten Tiere standardmäßig nach T-Zell (CD3+) und Makrophagen (Mac-3+) Infiltrationen untersucht. In beiden Fällen zeigten beide Gruppen vergleichbare Zahlen an infiltrierte T-Zellen und Makrophagen (Abb. 4.18). Die Zahl der T-Zellinfiltrate bei den GFP behandelten Tieren lag bei 397 (\pm 48,9) Zellen/mm², während sie bei den BDNF behandelten Tieren bei 386 (\pm 39,0) Zellen/mm² lag. Im Fall der Makrophageninfiltrate kamen Zellzahlen in Höhe von 519 (\pm 79,1) Zellen/mm² bei den GFP behandelten Tieren und 540 (\pm 62,9) Zellen/mm² bei den BDNF behandelten Tieren zustande.

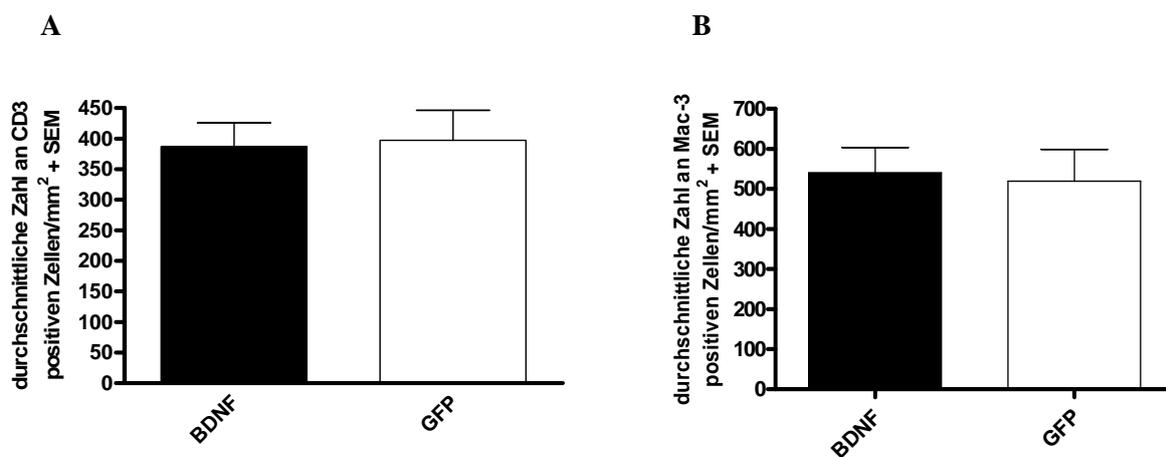


Abb. 4.18: Immunhistochemische Auswertung von Immunzellinfiltraten in C57Bl/6 Mäusen nach i.v. Injektion. C57Bl/6 Tiere wurden an Tag 7 nach Immunisierung mit BDNF bzw. GFP Virus transduzierten T-Zellen i.v. behandelt. Die Tiere wurden an Tag 22 perfundiert und die Rückenmarksschnitte nach CD3 (T-Zellspezifisch) bzw. Mac-3 (Makrophagenspezifisch) gefärbt. n=6. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes.

Da dem BDNF Protein axonprotektive Eigenschaften zugesprochen werden, ist die in diesem Zusammenhang interessantere Färbung, die Versilberung nach Bielschowsky gewesen, die

spezifisch Axone anfärbt und durch die Axondichten den Axonerhalt bestimmen kann. Die beiden Vergleichsgruppen zeigten in diesen Untersuchungen wesentliche Unterschiede untereinander. In der Auswertung wurden axonale Dichten in vier verschiedenen Regionen der Rückenmarksschnitte miteinander verglichen. Diese waren die Läsionen, die Periläsionen, Normal erscheinende weiße Substanz und graue Substanz. In den Läsionen und Periläsionen sollten die meisten Unterschiede zu erkennen sein, da dort die Immunreaktion abläuft und die infiltrierenden Zellen hauptsächlich dort vorgefunden werden. Auch die i.v. injizierten Virus transduzierten Zellen wandern zu den Läsionen und könnten dort ihre potenzielle neuroprotektive Funktion ausüben. Die Auswertung zeigte, dass die axonalen Dichten beider Gruppen in der grauen Substanz und der normal erscheinenden weißen Substanz vergleichbare Werte aufzeigten, während es beim Vergleich dieser beiden Gruppen in den Läsionen und Periläsionen doch signifikante Unterschiede gab (Abb. 4.19). Diese Unterschiede zeigten sich insbesondere in einer ca. 70 %-igen signifikanten Reduktion (** $p < 0,01$) der axonalen Dichte in den Läsionen der GFP behandelten Tiere im Gegensatz zu den BDNF behandelten Tieren. Auch die Axone in den Periläsionen waren in den BDNF behandelten Tieren signifikant (* $p < 0,05$) stärker erhalten als in der Kontrollgruppe. Die Auswertung der Färbung für APP unterstützte die vorangegangenen Daten zum axonalen Schaden und deckte eine um 36 % geringere Akkumulation von APP positiven Elementen in den BDNF behandelten Tieren auf, was ebenso auf einen geringeren axonalen Schaden hindeutet. Der Unterschied in der APP Akkumulation verglichen mit der Kontrollgruppe war zwar nicht signifikant, was aber darauf zurückzuführen ist, dass zu dem Zeitpunkt der Analyse womöglich die Zahl der APP positiven Elemente bereits insgesamt verringert war.

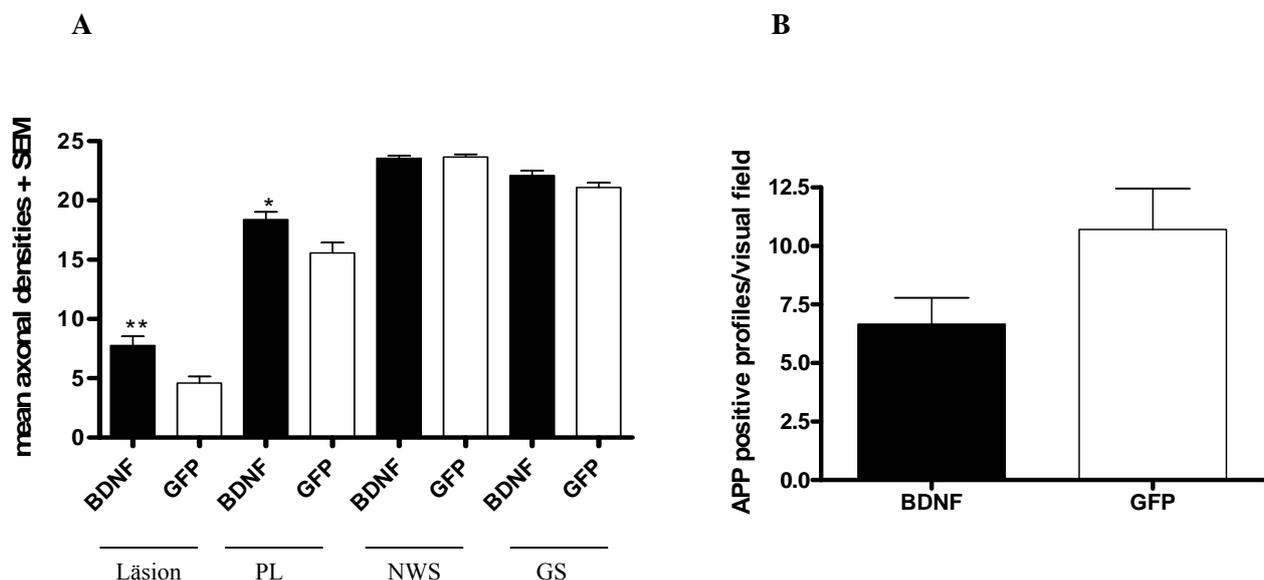


Abb. 4.19: Immunhistochemische Auswertung von axonalen Dichten und APP Akkumulationen in C57Bl/6 Mäusen nach i.v. Injektion. C57Bl/6 Tiere wurden an Tag 7 nach Immunisierung mit BDNF bzw. GFP Virus transduzierten T-Zellen i.v. behandelt. Die Tiere wurden an Tag 22 perfundiert und die Rückenmarksschnitte **A.** nach Bielschowsky versilbert (PL=Periläsion, NWS=normal erscheinende weiße Substanz, GS=graue Substanz) (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$) bzw. **B.** nach APP gefärbt. $n=6$. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.6 iNOS Expression

Ein Hauptakteur, der für die Entstehung von axonalem Schaden mitverantwortlich ist, ist das von Makrophagen und Mikroglia produzierte Stickstoffmonoxid (NO). Es wird nach Aktivierung dieser beiden Zelltypen über die induzierbare NO Synthetase (iNOS) synthetisiert und wirkt zytotoxisch. Daher kann die Untersuchung der iNOS Expression einen weiteren Hinweis für den axonalen Schaden und bei einem differenziellen Ergebnis zwischen den Kontrollgruppen eventuell auch für die neuroprotektive Funktion des BDNF vermittelt durch BDNF überexprimierende i.v. injizierte T-Zellen sprechen. Für das Auszählen der iNOS positiven Zellen wurde eine semi-quantitative Methode bevorzugt, weil die iNOS Expression am Höhepunkt der Erkrankung am höchsten ist und die Aktivität in der chronischen Phase abnimmt. Da die Versuchstiere bereits in der chronischen Phase waren, als sie aufgearbeitet wurden, konnte durch die semi-quantitative Analyse ein aussagekräftigeres Ergebnis erzielt werden. Die immunhistochemische Auswertung der Rückenmarksschnitte beider Vergleichsgruppen zeigte auf signifikante (* $p < 0,05$) Art und Weise, dass die iNOS Expression in den BDNF behandelten Tieren im Vergleich zu der GFP Kontrollgruppe um die Hälfte reduziert war (Abb. 4.20). Die verminderte iNOS Expression in BDNF behandelten Tieren unterstützt die Daten zum axonalen Schaden und könnte ein Erklärungsansatz für den stärkeren Axonerhalt in BDNF behandelten Tieren sein.

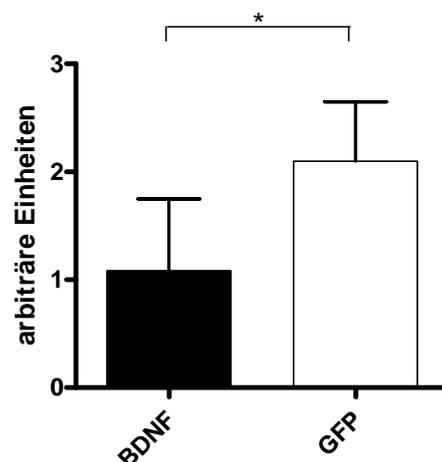


Abb. 4.20: Immunhistochemische Auswertung der iNOS Expression in C57Bl/6 Mäusen nach i.v. Injektion. C57Bl/6 Tiere wurden an Tag 7 nach Immunisierung mit BDNF bzw. GFP Virus transduzierten T-Zellen i.v. behandelt. Die Tiere wurden an Tag 22 perfundiert und die Rückenmarksschnitte nach iNOS gefärbt (* $p < 0,05$). Definition arbiträrer Einheiten: 1=geringe iNOS Expression, 2=mittlere iNOS Expression, 3=hohe iNOS Expression. $n=6$. Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

4.2.7 pTrkB Expression

Da die BDNF Überexpression in den Läsionen aus technischen Gründen nicht direkt nachgewiesen werden konnte, so wurde versucht den Nachweis der Überexpression und die Funktionalität des Systems durch den BDNF spezifischen Rezeptor TrkB zu erbringen. Dieser Rezeptor wird nach Bindung an seinen Liganden, dem BDNF Protein, phosphoryliert und kann so mit Hilfe eines phosphoTrkB (pTrkB) spezifischen Antikörpers detektiert werden. Für diese Untersuchungen wurden mit den Rückenmarksschnitten der mit BDNF und GFP transduzierten T-Zellen behandelte Tiere eine Fluoreszenzdoppelfärbung mit dem pTrkB und dem T-Zell (CD3) bzw. Makrophagen (Mac-3) spezifischen Antikörper durchgeführt. Dadurch sollte neben der pTrkB Expression auch eine mögliche Colokalisation des BDNF spezifischen Rezeptors mit den infiltrierenden Immunzellen detektiert werden. Was zunächst besonders auffiel, war, dass die pTrkB Expression nur auf die Läsionen begrenzt war, für die die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen charakteristisch ist und mit deren Hilfe auch detektiert werden kann (Abb. 4.21). Des Weiteren war deutlich zu erkennen, dass die pTrkB Expression in den BDNF behandelten Tieren wesentlich stärker war als in der GFP Kontrollgruppe. In der Doppelfärbung mit T-Zell und Makrophagen spezifischen Antikörpern konnte jedoch kaum eine Colokalisation von pTrkB und den infiltrierenden T-Zellen und Makrophagen detektiert werden.

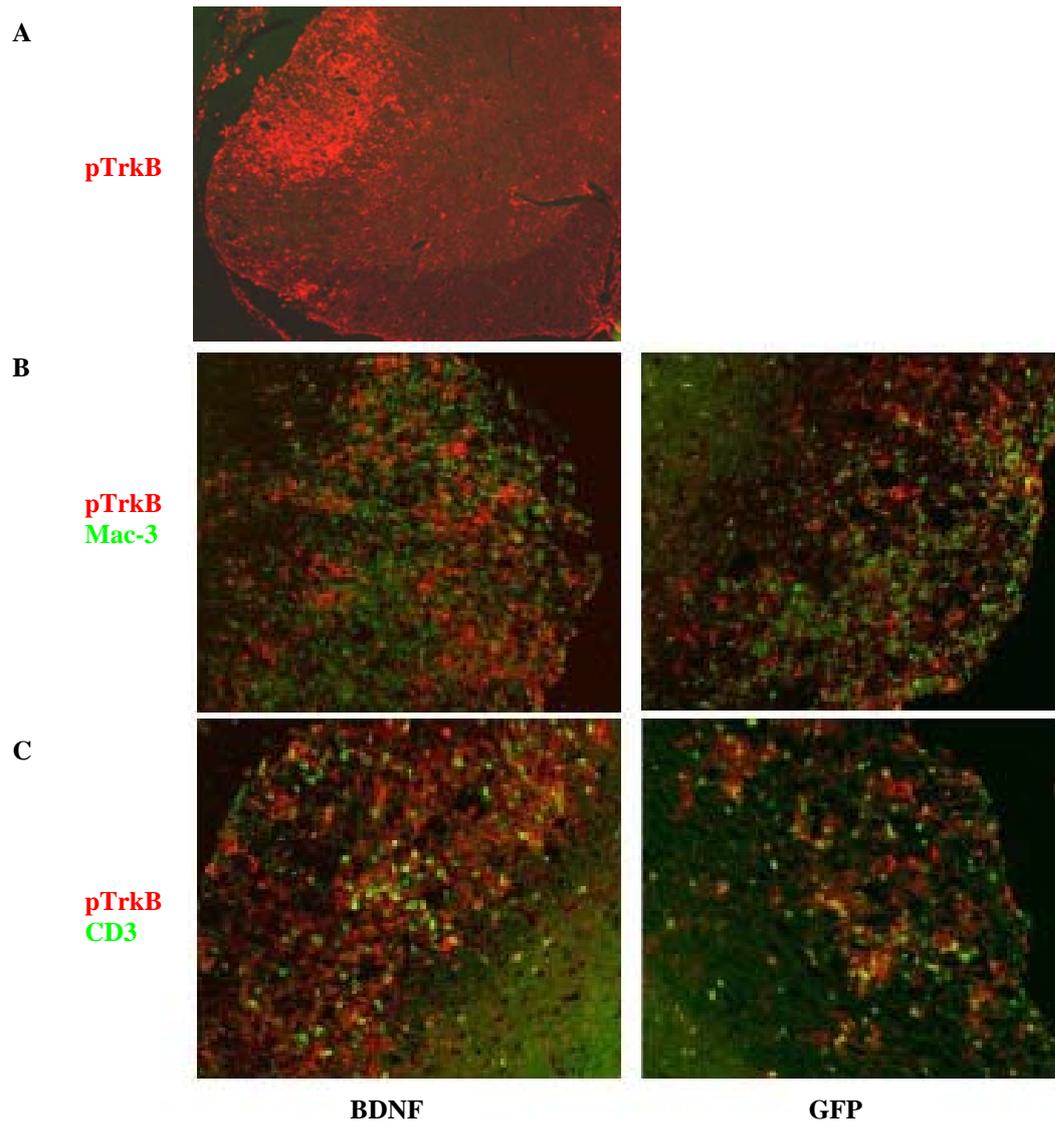


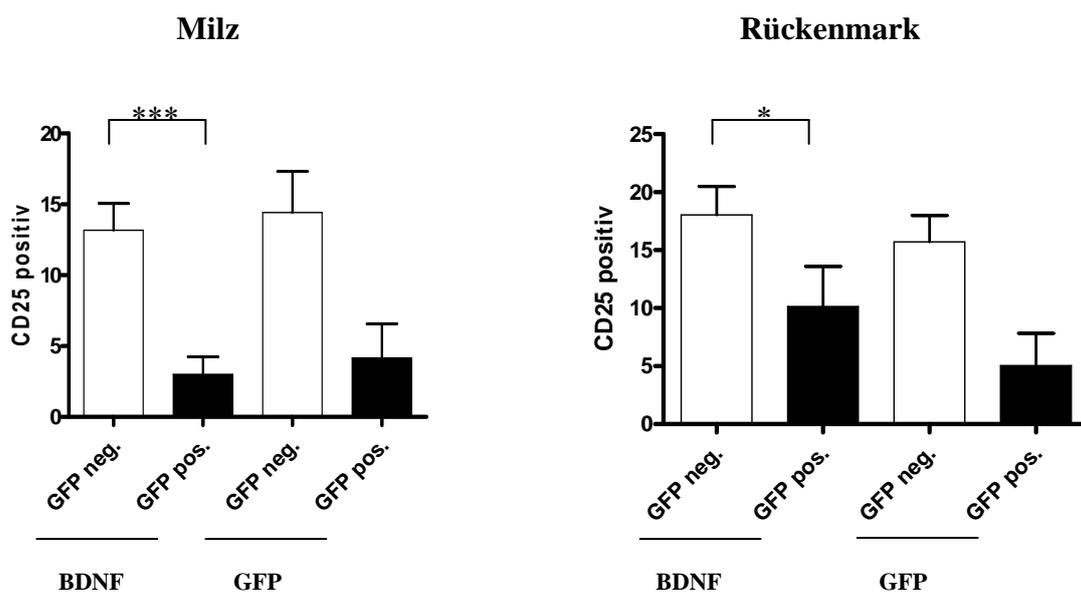
Abb. 4.21: Funktionelle Relevanz der BDNF Überexpression *in situ* anhand Fluoreszenzmikroskopischer Analysen der pTrkB Färbung. C57Bl/6 Tiere wurden an Tag 7 nach Immunisierung mit BDNF bzw. GFP Virus transduzierten T-Zellen i.v. behandelt. Die Tiere wurden an Tag 22 perfundiert und die Rückenmarkschnitte nach pTrkB (rote Fluoreszenz) gefärbt. **A.** pTrkB Färbung in der Übersicht. Die Aufnahme wurde mit einem 20x Objektiv angefertigt. **B.** pTrkB Doppelfärbung mit Mac-3 (grüne Fluoreszenz, spezifisch für Makrophagen und aktivierte Mikroglia). **C.** pTrkB Doppelfärbung mit CD3 (grüne Fluoreszenz, spezifisch für T-Zellen). Die Aufnahmen in B und C wurden mit einem 40x Objektiv angefertigt.

4.2.8 Aktivierungsstatus i.v. injizierter T-Zellen *in vivo*

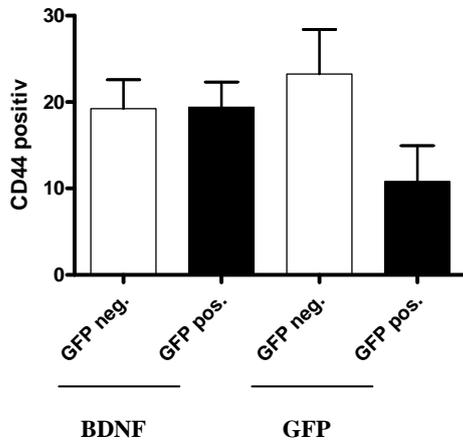
Der Aktivierungsstatus i.v. injizierter T-Zellen wurde ermittelt, um festzustellen inwieweit die applizierten T-Zellen *in vivo* aktiviert werden. Es ging vor allem darum zu sehen, ob diese Zellen soweit aktiviert werden, dass sie eventuell auch am Entzündungsprozess beteiligt sein könnten, oder ob sie wie vermutet lediglich als sog. *Bystander* Zellen mit den entzündlichen Komponenten in das ZNS einströmen.

Dafür wurden MOG-spezifische und GFP positive T-Zellen aus transgenen 2D2 Mäusen, die zusätzlich noch ein Transgen für GFP besitzen, isoliert. Pro Empfängertier wurden je 10 Millionen dieser naiven T-Zellen mit dem BDNF bzw. GFP Virus infiziert und in C57BL/6 Tiere, in denen zuvor eine EAE ausgelöst wurde, i.v. injiziert. Die Injektion erfolgt wie bereits zuvor an Tag 7 nach Immunisierung. Die Tiere wurden am Höhepunkt ihrer Erkrankung aufgearbeitet. Dafür wurde das Rückenmark und die Milz der Tiere entnommen. Mit dem Rückenmark wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, um die infiltrierten Lymphozyten zu isolieren. Die Milzen wurden mit Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt, um die Erythrozyten aus dem Zellgemisch zu entfernen. Anschließend wurden die Lymphozyten aus dem Rückenmark und im Vergleich dazu die Milzzellen mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, um diese letztlich im Durchflusszytometer zu analysieren. Um die applizierten T-Zellen aus dem Zellgemisch zu identifizieren, wurden diese mit dem T-Zellspezifischen Antikörper CD4 gefärbt und ergaben mit der GFP Fluoreszenz, die die applizierten T-Zellen durch ihr Transgen konstitutiv exprimieren, die gewünschte Zellpopulation. Des Weiteren wurden die Zellen mit verschiedenen Aktivierungsmarkern, wie CD25, CD44, CD62L und CD69, gefärbt, um den Aktivierungsstatus zu ermitteln. Durch die GFP Fluoreszenz der applizierten Zellen konnte auch eine Unterscheidung zu den endogenen T-Zellen getroffen werden, was einen Vergleich zwischen beiden Populationen ermöglichte. Die Messungen im Durchflusszytometer ergaben, dass in der Milz ca. 14 % der endogenen T-Zellen den frühen Aktivierungsmarker CD25 exprimieren, während die Expression bei den applizierten BDNF und GFP Virus infizierten T-Zellen um ein Vierfaches geringer war (Abb. 4.22). Die Expression im Rückenmark hingegen lag bei den BDNF Virus infizierten T-Zellen bei ca. 10 %, während fast doppelt so viele endogene T-Zellen CD25 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Bei den GFP infizierten T-Zellen lag die Expressionsrate bei 5 % und betrug somit nur ein Drittel der Expression der endogenen T-Zellen. Die Expression des späten CD44 Memory Markers zeigte in den applizierten T-Zellen in der Milz keinen sehr großen Unterschied zu den endogenen T-Zellen und lag ca. bei 20 %. Lediglich die GFP infizierten

T-Zellen zeigten eine nicht signifikante Verringerung der Expression verglichen mit den Kontrollzellen. Im Rückenmark hingegen war die Expression in den applizierten T-Zellen, die mit dem BDNF Virus infiziert wurden, signifikant ($***p<0,001$) um mehr als die Hälfte reduziert und lag nur noch bei 21 %. Die GFP infizierten Zellen zeigten zwar auch eine geringere Expression dieses Oberflächenmoleküls, welches aber nicht signifikant war. Die Expression des Aktivierungsmarkers, CD62L, welches auch gleichzeitig ein Adhäsionsmolekül ist, zeigte in allen untersuchten T-Zellpopulation in der Milz eine hohe Expression von ca. 40-60 %. Lediglich in den applizierten BDNF infizierten T-Zellen konnte eine signifikante Verringerung ($**p<0,01$) von ca. 20 % gegenüber den endogenen T-Zellen beobachtet werden. Im Rückenmark ging die Expression des CD62L stark herab und konnte lediglich in ca. 4 % der endogenen T-Zellen detektiert werden d.h. alle T-Zellen waren aktiviert. Die Expression in den applizierten T-Zellen war noch geringer und lag nur noch bei 1-2 %. Im Fall von CD69, welches ein früher Aktivierungsmarker ist war in der Milz die Expression in den BDNF infizierten T-Zellen fünfmal so hoch wie in den endogenen T-Zellen und betrug somit ca. 26 % ($**p<0,01$), während die Expression in den GFP infizierten T-Zellen ebenfalls signifikant ($*p<0,05$) erhöht war und ca. 17 % dieser Zellen CD69 exprimierten. Im Rückenmark war die Expression von CD69 sogar noch stärker erhöht und konnte in ca. 78 % der applizierten T-Zellen detektiert werden ($**p<0,01$; $*p<0,05$), wobei die Expression in den endogenen T-Zellen signifikant um mehr als die Hälfte verringert war.



Milz



Rückenmark

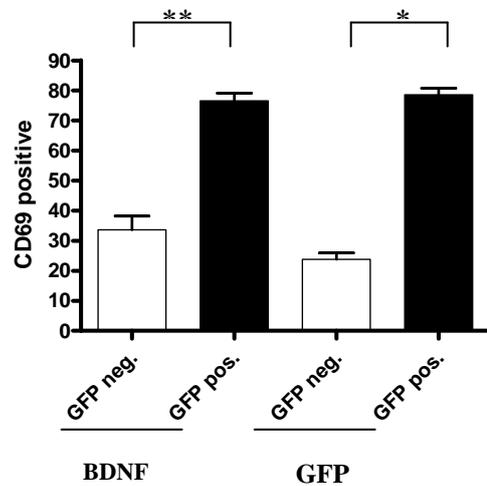
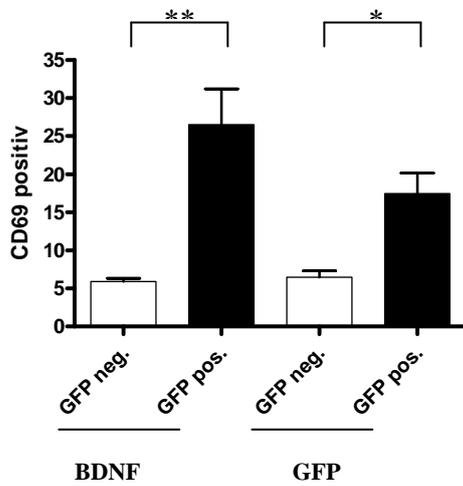
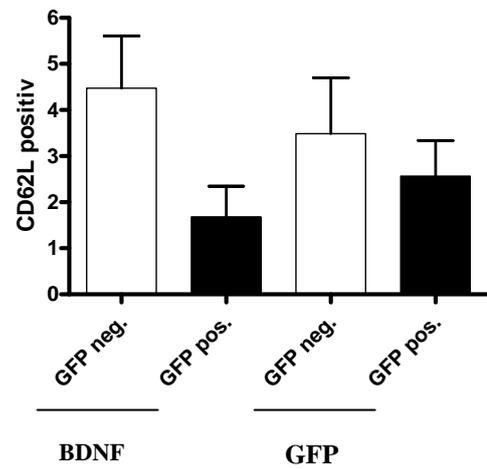
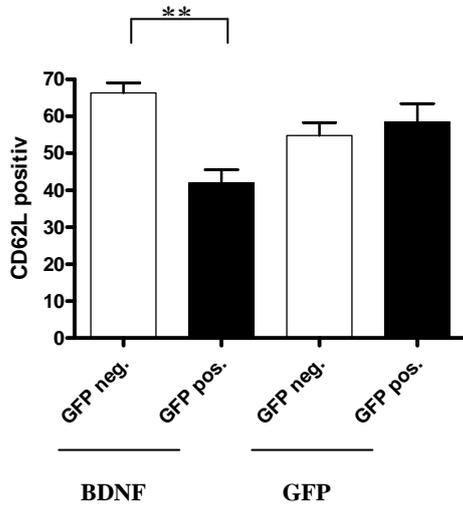
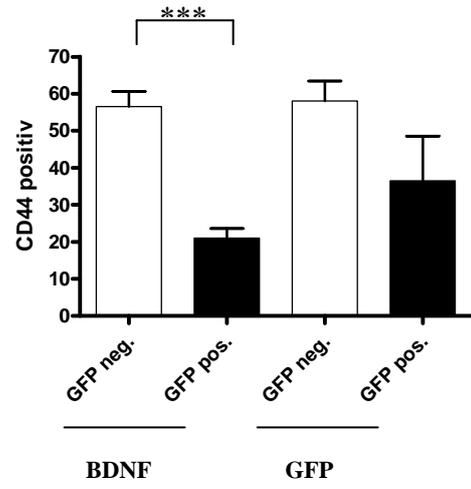


Abb. 4.22.: FACS Analyse der Aktivierungsmarker applizierter BDNF und GFP Virus transduzierter T-Zellen im Vergleich zu endogenen T-Zellen. C57BL/6 Tiere wurden an Tag 7 nach Immunisierung mit BDNF bzw. GFP Virus transduzierten T-Zellen i.v. behandelt. Am Höhepunkt der Erkrankung wurden die Lymphozyten aus dem Rückenmark und der Milz isoliert und mit den Aktivierungsmarkern CD25, CD44, CD62L und CD69 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. GFP pos. Balken (schwarz) repräsentieren die jeweils applizierten T-Zellen, während die GFP neg. Balken (weiß) die endogenen T-Zellen darstellen. CD25+CD44 n=11, CD62L+CD69 n=6. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. (**p<0,01; ***p<0,001; *p<0,05).

5. Diskussion

5.1. BDNF Expression und Regulation *in vitro* – *Splice*-Varianten

Das BDNF Protein wird durch ein einzelnes Exon codiert, deswegen sind auch keine anderen Isoformen auf Proteinebene bekannt, die auf alternatives *Splicing* zurückzuführen sind. Auf mRNA-Ebene jedoch wurden bereits mehrere *Splice*-Varianten in der 5' nichttranslatierten Region in Ratten (Altieri et al., 2004; Bishop et al., 1994; Timmusk et al., 1993) und Menschen (Aoyama et al., 2001; Liu et al., 2005) beschrieben, die auf ein hohes Maß an Regulation auf *Promoter* bzw. *Enhancer* Ebene hinweisen.

In einer parallel zu dieser Arbeit entstandenen Veröffentlichung wurde eine detaillierte Analyse der BDNF *Splice*-Varianten in der Maus durchgeführt, um die genomische Struktur des BDNF und seine differentielle Regulation besser zu verstehen (Liu et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass analog zu Ratte und Mensch, in den verschiedenen Regionen des Gehirns viele *Splice*-Varianten gefunden wurden, während die Expression der *Splice*-Varianten in den peripheren Organen beschränkter war (Liu et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf das Immunsystem fokussiert und ein Vergleich mit dem ZNS angestellt. Es wurde eine detaillierte Analyse der unterschiedlichen mBDNF *Splice*-Varianten in peripheren lymphatischen Organen, sowie speziellen Immunzellen, und aufgereinigten Zellpopulationen im Vergleich zum Gehirn angefertigt. Die Anwesenheit aller bekannten *Splice*-Varianten im Gehirn und die eingeschränktere Expression in der Peripherie konnte bestätigt werden. In allen untersuchten peripheren lymphatischen Organen war nur mBDNF 3 mRNA detektierbar. Liu et al. (2006) hingegen konnten in ihrer Arbeit auch die *Splice*-Varianten mBDNF 4 und 5 in der Milz nachweisen. Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit der gleiche Mausstamm benutzt, auch identische Primer wurden ausgetestet, jedoch waren diese Ergebnisse nicht reproduzierbar. Somit bleibt der Grund für diese Diskrepanz in der Milz ungeklärt. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch aufgereinigte T-Zellen und Makrophagen ausschließlich mBDNF 3 mRNA exprimieren. Quantitative Analysen zeigten, dass mBDNF 3 im Gehirn mit nur 1 % der Expression von mBDNF 1 mRNA unterrepräsentiert war. In peripheren lymphatischen Organen hingegen war die Expression von mBDNF 3 mRNA circa 2-3-mal höher als im Vergleich zum Gehirn. Da dieses Ergebnis auch in aufgereinigten T-Zellen erzielt wurde, könnte man vermuten, dass in diesen Organen T-Zellen die Hauptquelle für mBDNF 3 mRNA sind. Im Gegensatz dazu exprimieren unbehandelte Makrophagen nur circa 20 % der mBDNF 3 mRNA Menge im

Gehirn. Dieser Unterschied in der Detektion der verschiedenen mBDNF *Splice*-Varianten in der Peripherie bleibt noch ungeklärt. Um Mausstammspezifische Unterschiede auszuschließen wurden die Experimente zusätzlich mit Balb/c und FVB/N Mäusen durchgeführt, die aber zu den gleichen Ergebnissen führten. Mikroglia und Astrozyten werden durch ihre vielseitigen Funktionen als Antigenpräsentierende Zellen, Effektorzellen in der MS und phagozytotische Zellen für beschädigte Neuronen (Ambrosini and Aloisi, 2004; Jack et al., 2005) als immunologisch relevante Zellen im ZNS betrachtet. Aus diesem Grund erschien es als sehr interessant, die Expression der mBDNF mRNA auch in diesen spezialisierten Zellen des ZNS zu untersuchen. Es stellte sich heraus, dass diese beiden Zelltypen ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster der mBDNF mRNA hatten. In Astrozyten konnten alle mBDNF *Splice*-Varianten wiedergefunden werden. Zwar mit einigen quantitativen Unterschieden, aber dem gleichen Verteilungsmuster wie im Gehirn. Die zwei bedeutendsten *Splice*-Varianten hierbei waren die beiden *Splice*-Varianten mBDNF 1 und 4, die zwar die Mehrheit im Gehirn bildeten, jedoch in Astrozyten nur etwa 1-5 % erreichten, dafür war aber mBDNF5 in diesen Zellen überrepräsentiert. Ein ganz anderes Expressionsmuster zeigte sich in Mikroglia, Makrophagen und anderen peripheren Immunzellen, denn dort wurde ausschließlich mBDNF 3 exprimiert. Es wird angenommen, dass Makrophagen und Mikrogliazellen einen gemeinsamen Ursprung in hämatopoetischen Stammzellen haben und damit im Gegensatz zu Neuronen und anderen Gliazellen dem Mesoderm und nicht dem Neuroektoderm entstammen (Jordan and Thomas, 1988; Oemichen, 1978). Zudem besitzen beide Zelltypen die gleichen Oberflächenmoleküle und immunologischen Funktionen, auch in Bezug auf die Expression von mBDNF *Splice*-Varianten scheinen Mikroglia eher die peripheren Makrophagen wiederzuspiegeln als andere gliale Zellen, ein Unterschied, der auch auf eine potentielle funktionelle Relevanz hindeutet. Diese Ansicht wurde auch durch die Beobachtung unterstützt, dass nach Stimulation von Mikroglia sowie peripheren Makrophagen mit LPS eine verminderte Expression von mBDNF 3 mRNA zu detektieren war, während die Stimulation von Astrozyten keinen Einfluss auf die Expression der mBDNF *Splice*-Varianten hatte.

Die physiologische Relevanz der unterschiedlichen mBDNF *Splice*-Varianten und deren exakte Regulation sind bisher kaum aufgeklärt. Es wurde berichtet, dass die unterschiedlichen Promotoren für die verschiedenen *Splice*-Varianten in zwei verschiedenen *Clustern* lokalisiert sind. Das erste *Cluster* umfasst die Exons I, II, und III (beinhaltet *Splice*-Varianten 1, 2A, 2B, 2C und 3), während das zweite *Cluster* Exon IV, V und VI (beinhaltet *Splice*-Varianten 4, 5, 6A und 6B) umfasst (Liu et al., 2006). Für das zweite *Cluster* wurden einige transkriptionelle

Elemente, die CaRF (*Calcium-responsive transcription factor*), CREB (*cAMP/calcium-responsive element binding protein*) und MeCP2 (*methyl-CpG binding protein 2*) erkennen, beschrieben (Chen et al., 2003; Martinowich et al., 2003; Tao et al., 2002). Das Zusammenspiel der unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren und der daraus resultierenden Expression der unterschiedlichen BDNF *Splice*-Varianten wurde bisher noch nicht untersucht. Auch insbesondere die Regulation der einzelnen *Splice*-Varianten in den unterschiedlichen Geweben ist noch sehr unklar. In dieser Arbeit wurde daraufhin die Hypothese untersucht, ob NF- κ B, ein Transkriptionsfaktor, welches eine zentrale Rolle in der T-Zellaktivierung spielt, in der Regulation von mBDNF 3 mRNA involviert ist, vor allem, weil mBDNF 3 nach T-Zellaktivierung hochreguliert wird. Dafür wurde ein tet-induzierbares Modellsystem gewählt, bei dem der Transkriptionsfaktor NF- κ B in Thymozyten runterreguliert wird. Die Ergebnisse zeigten, dass nach Stimulation die Hochregulierung der mBDNF 3 mRNA in den Thymozyten dieses Modellsystems nicht anders war als in Wildtyp Thymozyten, was eine entscheidende Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der mBDNF mRNA Regulation ausschließt. Die Regulation der BDNF mRNA in aktivierten T-Zellen bleibt somit auf molekularer Ebene immer noch ungeklärt.

In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass die BDNF Expression in Immunzellen nach deren Aktivierung ansteigt (Barouch et al., 2001; Besser and Wank, 1999; Kerschensteiner et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Beobachtungen in T-Zellen (Thymozyten sowie reifen T-Zellen aus der Milz) auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Ganz speziell konnte hier gezeigt werden, dass der Anstieg der mBDNF mRNA ausschließlich auf die Hochregulierung der *Splice*-Variante mBDNF 3 zurückzuführen ist, und nur diese durch bisher noch unbekannte Transkriptionsfaktoren positiv reguliert wird, da durch die Aktivierung keine weiteren mBDNF *Splice*-Varianten exprimiert werden. Wenn Makrophagen mit LPS stimuliert werden, so sinkt überraschenderweise die Expressionsrate der mBDNF 3 mRNA. Diese Ergebnisse sprechen gegen frühere Befunde, bei denen die BDNF mRNA Expression nicht in naiven, aber in LPS stimulierten peritonealen Makrophagen detektierbar war (Barouch et al., 2001). Dieser Unterschied könnte aus methodischen Unterschieden resultieren, da in der zuvor erwähnten Studie keine Real-Time PCR sowie *Splice*-Varianten-spezifische Oligonukleotide eingesetzt wurden. Weiterhin haben Kerschensteiner et al. (1999) z.B. lediglich von einem geringen Expressionsniveau in Monozyten berichtet, ohne dabei einen Vergleich zwischen unbehandelten und stimulierten Zellen anzustellen. Die Hypothese, dass infiltrierende Immunzellen neuroprotektiv wirken könnten (Schwartz and Kipnis, 2001; Schwartz et al., 1999), wird durch die vorliegenden

Ergebnisse unterstützt, da stimulierte T-Zellen vermehrt BDNF exprimieren, welches wiederum auf neuronenschädigende Prozesse limitierend wirken könnte. Die Rolle des aus Makrophagen gewonnenen BDNF Proteins hingegen muss noch geklärt werden. Zusätzlich sind weitere Studien notwendig, die den genauen Mechanismus der Regulation der mBDNF 3 mRNA in Immunzellen aufdecken.

Zusammengefasst ist zu sagen, dass mBDNF mRNA im CNS und im Immunsystem unterschiedlich reguliert wird, was die Möglichkeit einer spezifischen Intervention in die BDNF Expression in Immunzellen bietet, ohne dabei systemisch auch das BDNF im ZNS zu beeinflussen. Dieser Signalweg könnte als potenzielles Ziel für neuroprotektive Therapien in neuroinflammatorischen Krankheiten, wie der MS, verwendet werden.

5.2. BDNF und dessen funktionelle Relevanz in der EAE

Neurotrophe Faktoren, wie BDNF, sind essenziell für die Entwicklung und den Erhalt des Nervensystems. Dem BDNF speziell werden potenzielle Effekte auf den Neuronenerhalt und dessen Plastizität während der Entwicklung und nach Verletzungen zugesprochen. Es ist bereits seit langem bekannt, dass im Nervensystem Neuronen die größte zelluläre BDNF-Quelle sind, zudem haben Kerschensteiner et al. (1999) zeigen können, dass auch aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten BDNF exprimieren. Diese Erkenntnis erlangte noch größeres Interesse als Stadelmann et al. (2002) in Gehirnschnitten von Multiple Sklerose Patienten BDNF um verschiedene Läsionen herum detektieren konnten. Weiterhin konnte diese Gruppe zeigen, dass das detektierte BDNF vermehrt in Immunzellen vorzufinden war. Auch der BDNF-Rezeptor gp145trkB konnte in Neuronen in unmittelbarer Umgebung der Läsionen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Untersuchungen wird angenommen, dass das von Immunzellen sezernierte BDNF-Protein eine neuroprotektive Rolle in der Multiplen Sklerose spielt.

Die Behandlung der Multiplen Sklerose konzentriert sich auf zwei Hauptbereiche. Zum Einen wird versucht die Entzündung einzudämmen und zum Anderen gliale und neuronale Funktionen wiederherzustellen bzw. direkt zu schützen. Zu den Therapieansätzen, die der Eindämmung der Entzündung dienen, zählen z.B. die zytokinbasierten Immuntherapien, die grundsätzlich auf zwei Methoden aufbauen. Zum Einen versucht man die Entzündung durch die Applikation von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IFN- β , IL-10, IL-4 oder TGF- β , runterzuregulieren oder man benutzt Inhibitoren von pro-inflammatorischen

Zytokinen. Vorsicht ist bei diesem Ansatz jedoch geboten, da es eigentlich keine Zytokinprototypen mit ausschließlich anti- oder pro-inflammatorischen Eigenschaften gibt. Die Wirkungsweise hängt vielmehr vom Zeitpunkt der Applikation bzw. dem momentanen Erkrankungsstatus ab. Außerdem gehören Zytokine einem sehr komplexen und hoch organisierten Netzwerk an, bei dem das Hinzufügen oder die Blockade einzelner Zytokine das Gleichgewicht empfindlich stören kann. Eine weitere Strategie zur Eindämmung der Entzündung ist die Verabreichung von Substanzen, die die Adhäsionsmoleküle blockieren. Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen spielen eine wichtige Rolle beim Einwandern von Leukozyten in das ZNS (Charo and Ransohoff, 2006). Leukozyten haften sich über Selektine (E-Selektin, P-Selektin, L-Selektin) an die Endothelzellen an, wonach es durch Integrininteraktionen zu einer festen Adhäsion der Leukozyten an das Endothel kommt. Gegen diese Interaktion greifen die Substanzen, die die Adhäsionsmoleküle blockieren, indem sie den pathogenetisch wichtigen Schritt der Leukozytenmigration unterbinden. Ein berühmter Kandidat unter den Antiadhäsionsmolekülen ist das Natalizumab, welches ein monoklonaler humanisierter Antikörper ist, der gegen das $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (VLA-4) auf der Oberfläche von Lymphozyten gerichtet ist. Studien mit MS Patienten zeigten, dass es nach einer Monotherapie mit Natalizumab zu einer Reduktion der Schübe um 67 % kam und, dass das Voranschreiten der Behinderung nach 2 Jahren deutlich verzögert war (Polman et al., 2006). Dieser Effekt konnte durch die Kombination von Natalizumab und intramuskulär verabreichtem IFN- β sogar noch verstärkt werden. Trotz überzeugender Studien gab es doch einen so schwerwiegenden Zwischenfall, dass die Anwendung dieses Mittels gründlich überdacht werden musste. Denn es wurde veröffentlicht, dass zwei Patienten, die Natalizumab in Kombination mit IFN- β erhalten hatten, eine durch das JC-Virus (Humanes Polyomavirus 2) hervorgerufene progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML) entwickelten, wonach als Folge einer der Patienten starb (Kleinschmidt-DeMasters and Tyler, 2005). Zwar ist noch nicht ganz klar, ob die Reaktivierung bzw. De-novo-Infektion des JC-Virus durch eine generelle Immunsuppression (Niino et al., 2006) oder durch einen spezifischen Effekt von Natalizumab (Ransohoff, 2005) hervorgerufen wurde, aber dieses Beispiel zeigt, dass auch dieser Therapieansatz nur sehr eingeschränkt und erst nach endgültigem Ausschluss einer möglichen JC-Virusinfektion anwendbar ist. Peroxysomproliferationsaktivierender Rezeptor γ (PPAR- γ)-Agonisten, wie z.B. Thiazolidinedione, stellten sich in einigen Studien auch als potenzielle Kandidaten für die MS Therapie heraus. Thiazolidinedione sind insulinsensibilisierende Verbindungen, die ursprünglich für die Therapie des Diabetes Typ 2 zugelassen wurden und wirken über die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors

PPAR γ (Pershadsingh et al., 2004). Neben ihren glukosesenkenden Eigenschaften haben diese Substanzen auch entzündungs- und wachstumshemmende Fähigkeiten. So können sie die T-Zellaktivierung verhindern, die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen reduzieren und die Resistenz gegenüber Zytotoxizität erhöhen (Dello Russo et al., 2003). In der EAE konnten Thiazolidinedione den klinischen Verlauf und die Gewebeschädigung verbessern (Storer et al., 2005), weiterhin deuten vorläufige experimentelle Untersuchungen darauf hin, dass diese Substanzen auch den Krankheitsverlauf von MS-Patienten positiv beeinflussen (Pershadsingh et al., 2004). Allerdings wurde in einer anderen Studie mit einem anderen Mitglied der Thiazolidinedione, als das in der zuvor berichteten Studie, gezeigt, dass die Behandlung mit dem PPAR- γ -Agonisten keine Unterschiede in verschiedenen MRT-Parameteren als auch im klinischen Verlauf zeigte. Somit muss auch dieser Therapieansatz erst einmal gründlich nach seiner Effektivität hin ausgetestet werden. Eine andere Möglichkeit zur Therapie der Multiplen Sklerose ist der Versuch gliale und neuronale Funktionen wiederherzustellen bzw. direkt zu schützen. Viele der anti-inflammatorischen Medikamente, die bereits in der MS Therapie eingesetzt werden, vermindern zwar die Schubrate, jedoch haben sie nur geringen Einfluss auf die Progression der Behinderung und die Gewebedegeneration. Daher steigt die Nachfrage nach Substanzen, die auf Neuroprotektion und Remyelinisierung abzielen. Zurzeit laufen interessante und vielversprechende Laborstudien zu diversen Neuroprotektiva. In diesem Zusammenhang wird zum Beispiel das Erythropoetin (Epo) untersucht, welches ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor der Erythropoese ist. Neben dieser Funktion besitzt Epo bemerkenswerte neuroprotektive Eigenschaften, die unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen im ZNS wie Ischämie, Hypoxie oder Inflammation zum Vorschein kommen (Genc et al., 2004). Epo und sein Rezeptor (EpoR) werden auf Neuronen exprimiert (Genc et al., 2006). Eine Untersuchung an EAE-Mäusen zeigte, dass die therapeutische Gabe von Epo die Schwere der Erkrankung deutlich abschwächte. Man geht davon aus, dass dieser Effekt auf die Reduktion des axonalen Schadens und der Demyelinisierung, eine verringerte Anzahl infiltrierender inflammatorischer Zellen und eine verminderte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen ist (Li et al., 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass Epo die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen fördert, die Neurogenese im Striatum und der subventrikulären Zone stimuliert und die BDNF Ausschüttung erhöht (Agnello et al., 2002). In Schlaganfallpatienten konnte bereits eine Reduktion des neurologischen Defizits und der glialen Schädigung nach *intravenös* verabreichtem Epo beobachtet werden (Ehrenreich et al., 2004), während eine Studie mit MS-Patienten momentan in Planung ist.

Das einzige Medikament, dem eine neuroprotektive Eigenschaft zugesprochen wird und das tatsächlich auch schon auf den Markt eingeführt wurde, ist das Laquinimod. Diese innovative Substanz zeichnet sich zunächst durch die orale und damit sehr praktikable Anwendung aus. Eine große Studie konnten deutlich zeigen, dass Laquinimod die Anhäufung von Läsionen in Multiple Sklerose Patienten um bis zu 40 % verhindert (Comi et al., 2008). Zudem besitzt diese Substanz auch eine anti-inflammatorische Eigenschaft, die vermutlich auf eine Th1 zu Th2 Verschiebung basiert (Zou et al., 2002).

Neuronale und axonale Degeneration werden auch stark von den Ionenkanälen beeinflusst. So führt z.B. die axonale Demyelinisierung zu Veränderungen in der zellulären und subzellulären Expression und Lokalisation von Natriumkanälen (Na_v). Studien, die solche pathophysiologischen Veränderungen aufzeigen, deuten darauf hin, dass subtypenspezifische Inhibitoren bestimmter Ionenkanäle die neuronale bzw. axonale Degeneration abschwächen könnten. In Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass der Natriumkanalblocker Phenytoin die Demyelinisierung des Sehnervs und des Rückenmarks reduziert (Lo et al., 2003). Neuere Befunde geben Hinweise darauf, dass die Aktivierung von Mikrogliazellen und infiltrierenden Makrophagen während der Entzündung des ZNS wesentlich durch $\text{Na}_v1.6$ beeinflusst wird. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung, dass Phenytoin die Anzahl infiltrierender Entzündungszellen bei der EAE reduziert (Craner et al., 2005). Weitere wichtige Faktoren, die zur Neuroprotektion beitragen sollen sind neurotrophe Faktoren, diese sind wie bereits beschrieben Proteine, die das Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen regulieren (Thoenen and Sendtner, 2002) und über spezifischen Neurotrophinrezeptoren wirken (Bothwell, 1995). Scheinbar können neurotrophe Faktoren das Zytokingleichgewicht im ZNS durch bisher noch unbekannte Mechanismen in Richtung anti-Inflammation verlagern (Villoslada et al., 2000), zudem fördern sie möglicherweise das Überleben von Neuronen in MS-Läsionen (Kerschensteiner et al., 2003). Aus diesem Grund scheint die exogene Anwendung neurotropher Faktoren prinzipiell ein viel versprechender therapeutischer Ansatz zu sein. In einem Tiermodell der EAE wurde bereits die systemische Applikation von CNTF in Wildtyp BL/6 Mäusen untersucht (Kuhlmann et al., 2006). Die *intraperitoneale* Verabreichung von niedrigen Dosen des CNTF während der akuten Phase einer MOG induzierten EAE, führte nicht zu systemischen Nebenwirkungen, wie Änderungen in der peripheren Immunantwort, zeigte aber einen verminderten Krankheitsverlauf. Es wurde beobachtet, dass die Zahl an perivaskulären Infiltraten und die Menge an aktivierten Mikroglia im Rückenmark reduziert waren. Dieser Effekt des CNTF auf die Entzündung im Rückenmark kann höchstwahrscheinlich nicht direkt mit einem Effekt

dieses Zytokins auf die T-Zellen in Verbindung gebracht werden, da diese Zellen nicht die Rezeptoruntereinheiten CNTFR α und LIFR β exprimieren (Hilton et al., 1988; Hilton et al., 1991; Sleeman et al., 2000). Es ist eher möglich, dass das CNTF die Immunantwort im Rückenmark über immunmodulierende Moleküle, die von Mikroglia produziert werden, beeinflusst, da bereits bekannt ist dass CNTF auf diese Zellpopulation eine Wirkung hat (Hagg et al., 1993; Kahn et al., 1995). Oder CNTF könnte einen direkten neuroprotektiven Effekt ausüben, der den initialen Myelin- bzw. Axonschaden verhindert und dadurch auch die sekundäre entzündliche Antwort blockiert (Aboul-Enein et al., 2004). Neben dieser Studie, die einen verbesserten EAE-Verlauf nach CNTF Applikation aufweist, wurde auch ein gegenteiliges Experiment durchgeführt, bei dem der EAE-Verlauf in CNTF defizienten Mäusen untersucht wurde (Linker et al., 2002). Diese Studie ergab, dass die Mäuse, die kein CNTF exprimierten einen schwereren Erkrankungsverlauf im Vergleich zu Kontrolltieren nach Induktion einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), aufwiesen (Linker et al., 2002). In der späten Phase der Erkrankung litten CNTF defiziente Mäuse immer noch an Paraplegie, während bei den Kontrolltieren nur noch eine Gangataxie zu erkennen war. Auf der histologischen Ebene könnte die erhöhte Suszeptibilität der CNTF defizienten Mäuse durch eine 60 %ige Verringerung der proliferierenden Vorläuferzellen der Oligodendrozyten zu erklären sein. Diese beiden Untersuchungen zeigen deutlich die Bedeutung neurotropher Faktoren in den entzündlichen, demyelinisierenden Erkrankungen, wie der MS bzw. seinem Tiermodell, der EAE. So liegt es auch nahe, weitere neurotrophe Faktoren, wie das BDNF, in dieser Erkrankung zu erforschen, um mögliche ähnliche neuroprotektive Effekte aufzudecken und als neue therapeutische Ziele anzubieten.

Zudem werden inflammatorischen Zellen, nicht zuletzt durch die Expression von neurotrophen Faktoren, auch eine neuroprotektive Funktion nachgesagt, deren Beachtung relevant für beide, die immunsuppressiven und neuroprotektiven, Behandlungsziele der MS ist. Denn es konnte gezeigt werden, dass die therapeutische Applikation von aktivierten autoimmunen T-Zellen nach einer partiellen Quetschung des Sehnervs eine sekundäre Degeneration verhindern konnte (Moalem et al., 1999). Der genaue Mechanismus dieser Neuroprotektion ist zwar nicht bekannt, aber Untersuchungen an einem Modell der partiellen Quetschung des Sehnervs haben gezeigt, dass nach Applikation eines Tyrosinkinase-assoziierten Inhibitors der neuroprotektive Effekt der autoimmunen T-Zellen teilweise verhindert wurde (Moalem et al., 2000). Der beschriebene Inhibitor inhibiert spezifisch die Tyrosinkinaserzeptoren, über die auch die Neurotrophinwirkung vermittelt wird, und blockiert diese TrkA, TrkB und TrkC Rezeptoren ungefähr gleichermaßen, ohne dabei andere

Tyrosinkinase Signalwege zu beeinflussen (Berg et al., 1992; Koizumi et al., 1988; Nye et al., 1992; Tapley et al., 1992). Das Ergebnis, dass der Tyrosinkinase-assoziierte Inhibitor den Schutz vor sekundärer Degeneration vermindert, deutet darauf hin, dass die Neuroprotektion, die nach Applikation von autoimmunen T-Zellen erreicht wird, mitunter Neurotrophin vermittelt ist.

Man sollte bei der nichtselektiven immunsuppressiven MS-Therapie z.B., welches für gewöhnlich in der Multiplen Sklerose eingesetzt wird, beachten, dass womöglich nicht nur die autoaggressiven Angreifer, sondern auch die potentiell neuroprotektiven gutartigen autoimmunen Zellen eliminiert werden. Dies könnte auch den Grund für den teilweise nur sehr eingeschränkten klinischen Erfolg dieser Therapie liefern (Hohlfeld, 1997; Noseworthy et al., 1999). Daher rücken immer stärker neuere Therapieansätze in den Mittelpunkt, die sich mit der selektiven Modulation der autoimmunen Reaktion beschäftigen (Hemmer et al., 2002; Hohlfeld, 1997). Neue Behandlungsziele betreffen vor allem den Erhalt bzw. die Verstärkung der potenziell neuroprotektiven Funktion der gutartigen autoreaktiven T-Zellen, zu denen auch regulatorische T-Zellen (Treg) zählen. Treg sind CD4⁺ CD25⁺ selbstreaktive T-Zellen, die im Thymus durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 der negativen Selektion entkommen und in die Treg Linie gelenkt werden (Ghiringhelli et al., 2005; Sakaguchi, 2005; von Boehmer, 2005). Im Gegensatz zu den aggressiven selbstreaktiven T-Zellen haben Treg Zellen, die Foxp3 exprimieren, eine Suppressorfunktion und sind daher entscheidend, um generell multiple Organe vor Autoimmunität zu schützen (Kim et al., 2007; Sakaguchi, 2005). Die Bedeutung von Treg Zellen in der Begrenzung des autoimmunen Gewebeschadens konnte im Tiermodell der Multiplen Sklerose (Kohm et al., 2002), der Typ-1-Diabetes (Herman et al., 2004; Piccirillo et al., 2005) und der rheumatoiden Arthritis (Morgan et al., 2003) gezeigt werden. Auch im Menschen konnte eine Verminderung der Treg Zellzahl bzw. ihrer suppressiven Funktion in der Multiplen Sklerose demonstriert werden (Haas et al., 2005; Viglietta et al., 2004), was einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung dieser Zellen in der Autoimmunität liefert.

Von einem erfolgreichen Ansatz mit dem Neurotrophin BDNF und dessen mögliche therapeutische Wirkung in neurodegenerativen Erkrankungen wurde bereits in einem Mausmodell der Motorneurodegeneration berichtet (Mitsumoto et al., 1994). Bislang sind aber therapeutische Ansätze mit BDNF in humanen Motoneuronenerkrankungen misslungen (1999), was womöglich auf die limitierte Verfügbarkeit des BDNF im ZNS zurückzuführen ist (Dittrich et al., 1996). Auch die exogene Applikation von freiem BDNF war ineffizient in einem Modell der experimentellen autoimmunen Neuritis (Felts et al., 2002). Eine andere

Möglichkeit der BDNF Applikation wurde in einem Modell der akuten Rückenmarksverletzung getestet, bei dem ein Katheter intrathekal eingesetzt und mit einer osmotischen Pumpe betrieben wurde (Kim and Jahng, 2004). Dafür wurde rekombinantes BDNF in einer künstlichen Cerebrospinalflüssigkeit gelöst und kontinuierlich verabreicht. Dieser Versuchsansatz zeigte zwar einen positiven Effekt auf die Rückenmarksverletzung, jedoch ist diese Art der Applikation nicht sehr praktikabel. Osmotische Pumpen haben den Nachteil, dass die Apparatur eventuell Infektionen von außen mit in das angebundene Gewebe bringen kann, außerdem sind die übertragenen Konzentrationen des Neurotrophins weit über den physiologischen Mengen und deshalb auch gerade für Langzeitexperimente nicht geeignet.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit für die funktionellen Untersuchungen ein Ansatz gewählt, in dem BDNF überexprimierende T-Zellen mittels lentiviraler Transduktion generiert und deren Relevanz im EAE Modell getestet wurde. Studien zur effizienteren lentiviralen Transduktion zeigten, dass nach Polybrenezugabe und Zentrifugation der T-Zellen mit den lentiviralen Partikeln eine 6fach höhere Transduktionseffizienz erzielt werden konnte verglichen mit Kontrollzellen, die unbehandelt blieben (Costello et al., 2000). Polybrene ist ein kationisches Polymer, welches durch das Herabsetzen der Oberflächenspannung die Transduktion des Virus erleichtern soll, die zusätzliche Zentrifugation schafft eine engere räumliche Nähe und somit mehr Angriffsfläche für das Virus. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden murine T-Zellen standardmäßig mit den lentiviralen Partikeln zentrifugiert und auch mit Polybrene versetzt, was im Vergleich zu den Ansätzen ohne Polybrenezugabe zu einer 5fach höheren Transduktionseffizienz mit dem BDNF Lentivirus führte. Der Erfolg der Transduktion war jedoch sehr variabel und machte aus diesem Grund den Versuchsansatz sehr aufwendig. Eine in diesem Zusammenhang relevante Veröffentlichung (Baumann et al., 2004), die einen Vergleich zwischen der Transduktion humaner und muriner T-Zellen anstellte, gab Erklärungsansätze für die heterogenen Transfektionserfolge in unserem murinen System. Dieser Vergleich zeigte, dass primäre murine CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur humanen T-Zelllinie HuT78/CCR5 eine sehr viel geringere Suszeptibilität für die Transduktion durch HIV-1, einem Vertreter der Lentiviren, besitzen. Zum einen liegt es wohl daran, dass murinen T-Zellen notwendige Faktoren für einen erfolgreichen Eintritt des Virus in die Zelle fehlen, wie z.B. die humane Form des HIV-1 Rezeptors und Co-Rezeptormoleküle, wie CD4 und CCR5, deren murine Orthologe den HIV-1 Eintritt nicht unterstützen (Browning et al., 1997). Im Gegensatz dazu nutzen die Viren für diese Funktion die murine Form des CXCR4 als Co-Rezeptor (Bieniasz

et al., 1997; Tachibana et al., 1997). Deswegen verläuft der Viruseintritt noch relativ effizient, während sich größere Schwierigkeiten bei der Komplettierung der reversen Transkriptase und des Kerntransfers des Präintegrationskomplexes ergeben. Auf diesen Ebenen scheinen murine T-Zellen wichtige Instrumente zu besitzen, die die virale Infektion effektiv blocken können und somit die Transduktionseffizienz stark herabsetzen. Diese Blockiermechanismen spiegelten sich auch in unseren Experimenten wieder, indem virale Transduktionen nicht immer effizient waren und auch nur geringe BDNF Proteinkonzentrationen nach viraler Transduktion detektierbar waren. Wenn man jedoch bedenkt, dass endogene BDNF Proteinexpressionen in murinen T-Zellen so gering sind, dass sie mit den derzeit verfügbaren technischen Mitteln kaum detektierbar sind, so stellen diese geringen aber detektierbaren Mengen eine doch wesentliche Steigerung der BDNF Expression in murinen T-Zellen dar. Des Weiteren ist zu Bedenken, dass in unserem System BDNF nicht systemisch verabreicht wird, sondern sehr lokal, direkt in den Läsionen, überexprimiert wird, und somit davon ausgegangen werden kann, dass die produzierte BDNF Menge ausreicht, um einen lokalen potenziell benefiziellen Effekt auszuüben.

Um sicherzustellen, dass das in den lentiviralen Vektor einklonierte BDNF auch bioaktiv war und somit seine Funktion ausüben konnte, wurde ein BDNF *Bioassay* durchgeführt. Dieser *Assay* ist ein standardisiertes Verfahren (Wiese et al., 1999; Wiese et al., 2001) und zeigte, dass in den Virusüberständen bioaktives BDNF vorhanden war. Da das Protokoll eine recht hohe Verdünnung des Virusüberstandes in der zu testenden Zellkultur vorsieht, wurden nicht die Überstände der T-Zellen nach viraler Transduktion verwendet, da dort die initialen Konzentrationen bereits sehr gering waren, sondern die Überstände der Zellen, die ursprünglich das Virus hergestellt haben, denn auch dort wurden bereits während der Virusproduktion die Produkte des lentiviralen Vektors in den Überstand sezerniert. Ein Vergleich der Überstände zeigte, dass der BDNF Virusüberstand das Überleben der Ganglien auf signifikante Art und Weise gewährleistete, während Ganglien, die mit dem GFP Virusüberstand versetzt wurden kaum überlebten.

Für die *in vivo* Versuche wurden MOG-spezifische T-Zellen aus T-Zellrezeptor transgenen Mäusen (2D2) verwendet, da MOG das Peptid ist, welches in unserem EAE-Modell angegriffen wird und auch die endogenen T-Zellen, die in das ZNS infiltrieren hauptsächlich MOG spezifische Epitope besitzen. Diese 2D2 T-Zellen können im naiven Zustand keine EAE auslösen, dafür müssten sie zunächst *in vitro* in eine Th Untergruppe polarisiert werden, die durch ihr Zytokinprofil dazu in der Lage ist den ganzen Entzündungsprozess in Gang zu setzen. Eine erst kürzlich erschienene Studie (Jager et al., 2009) hat sich mit der Polarisation

dieser speziellen MOG-spezifischen T-Zellen und ihrer Fähigkeit der EAE Induktion beschäftigt. Die Th1 Untergruppe wurde früher als der eigentliche Verursacher der EAE betrachtet. Man kann Th1 polarisierte T-Zellen erhalten, indem man sie *in vitro* mit IL-12 behandelt. Das charakteristische Zytokin welches sie nach Polarisation sezernieren ist das pro-inflammatorische IFN- γ , welches bereits in entzündlichen ZNS Läsionen detektiert werden konnte und bekannt für seine Aktivierung von Makrophagen ist (Merrill et al., 1992). Neuerdings wird aber auch eine andere Th Untergruppe für die EAE Induktion verantwortlich gemacht, und zwar das Th17. Naive T-Zellen können *in vitro* mit Hilfe von TGF- β und IL-6 zu Th17 Zellen polarisiert und mit IL-23 stabilisiert werden (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Charakteristische Zytokine, die von Th17 Zellen exprimiert werden sind IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22. Eine weitere pathogene Untergruppe sind die Th9 Zellen, die durch TGF- β und IL-4 polarisiert werden und danach große Mengen an IL-9 und IL-10 sezernieren (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Die letzte Th Untergruppe bilden die Th2 Zellen, die jedoch nicht in der Lage sind eine EAE auszulösen, da sie eher anti-inflammatorische Prozesse induzieren (Baron et al., 1993; Merrill et al., 1992). Die MOG-spezifischen T-Zellen einer 2D2 Maus wurden *in vitro* zu den verschiedenen Untergruppen polarisiert und C57BL/6 Wildtyp Tieren injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur Th1 Zellen, sondern auch Th17 als auch Th9 Zellen eine EAE mit ähnlichem klinischem Ausmaß auslösen können (Jager et al., 2009). Es wurde außerdem beobachtet, dass die zu applizierenden Zellen mindestens über zwei Zyklen stimuliert werden müssen, um überhaupt eine EAE auszulösen. Die Th17 polarisierten Zellen können zwar bereits nach dem ersten Stimulationszyklus eine EAE auslösen, jedoch wird dieser Effekt durch die zusätzliche Gabe von Pertussistoxin, welches normalerweise in der aktiven Immunisierung mit dem MOG Antigen verwendet wird, verhindert (Jager et al., 2009). Nach dem zweiten Stimulationszyklus jedoch konnten die Th17 Zellen auch in Anwesenheit von Pertussistoxin eine EAE auslösen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten MOG-spezifischen T-Zellen der 2D2 Mäuse wurden vor Applikation weder polarisiert noch stimuliert, außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass lediglich die Applikation dieser naiven T-Zellen keine EAE in C57BL/6 Tieren auslösen konnte. Aus diesem Grund erscheint es eher unwahrscheinlich, dass die MOG-spezifischen T-Zellen, die in dieser Versuchsreihe verwendet wurden, zum Entzündungsprozess beitragen. Die Frage, ob die injizierten naiven MOG-spezifischen T-Zellen in den EAE induzierten Mäusen nach Applikation in eine aggressive Subform der Th Zellen getrieben werden kann eher ausgeschlossen werden, da die Applikation dieser Zellen den Erkrankungsverlauf nicht negativ, sondern eher positiv beeinflusst haben.

Neben den MOG-spezifischen T-Zellen wurde auch die Injektion von lediglich GFP positiven T-Zellen einer GFP transgenen Maus mit C57Bl/6 Hintergrund nach Induktion einer EAE ausgetestet. Diese injizierten T-Zellen konnten aber nicht im ZNS nachgewiesen werden, während MOG-spezifische T-Zellen sowohl immunhistochemisch als auch mit Hilfe der Durchflusszytometrie im ZNS nachweisbar waren. Dies bestätigte die bevorzugte Wahl der MOG-spezifischen T-Zellen und machte das *Homing* der behandelten T-Zellen zu den Läsionen wahrscheinlicher.

Zuvor wurden aber reine GFP positive T-Zellen verwendet, um die Überlebensrate i.v. injizierter und mit dem BDNF Lentivirus infizierter T-Zellen *in vivo* ohne EAE Induktion zu untersuchen. Die Analyse der Milzen zeigten, dass sogar nach 21 Tagen noch GFP positive T-Zellen in der Milz nachweisbar sind und, dass diese mehr BDNF exprimieren als unbehandelte T-Zellen, die ebenfalls i.v. injiziert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass T-Zellen sofern sie sich nicht in einem entzündlichen Milieu befinden relativ lange *in vivo* überleben können, dies ändert sich jedoch, wenn T-Zellen in die entzündlichen Läsionen im ZNS gelangen. Dort wurde beobachtet, dass T-Zellen die über ihren T-Zellrezeptor aktiviert wurden, durch den AICD (*activation-induced cell death*) Signalweg in die Apoptose getrieben werden (Green et al., 2003; Krammer, 2000). Dieser Mechanismus dient dem Beenden der Immunantwort und wirkt somit der hohen proliferativen Kapazität der Antigen-stimulierten Lymphozyten entgegen, und versucht dadurch auch gleichzeitig die Lymphozyten Homöostase aufrecht zu erhalten. Dieser extrinsische Signalweg wird mit Hilfe von sogenannten *death* Rezeptoren, wie dem CD95 (Apo-1/Fas), gesteuert (Krammer, 2000; Krueger et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit kann man davon ausgehen, dass im ZNS die endogenen Lymphozyten, die durch das Antigen relativ stark stimuliert werden und den Entzündungsprozess in Gang setzen, über diesen Apoptoseweg wieder aus dem ZNS entfernt werden. Für die injizierten T-Zellen hingegen, die im ZNS nicht so stark stimuliert sind, könnte ein zweiter, intrinsischer Apoptoseweg, das ACAD (*activated T cell autonomous death*), in Frage kommen (Hildeman et al., 2002). Dieser Apoptoseweg, auch passiver Zelltod genannt, benötigt keine starke T-Zellrezeptor Aktivierung und wird auch nicht über *death* Rezeptoren reguliert. Vielmehr resultiert dieser Signalweg aus dem Mangel an Überlebensfaktoren und wird durch die Mitglieder der Bcl-2 Familie reguliert (Strasser, 2005). Übertragen auf diese Arbeit könnte dieser Apoptoseweg eine Möglichkeit sein, durch die die weniger aktivierten applizierten Lymphozyten wieder aus dem ZNS entfernt werden. Um diese Hypothese jedoch zu bestätigen sind noch weitere Studien erforderlich, die in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurden.

Die Beobachtung, dass T-Zellen nach einer gewissen Zeit wieder aus dem ZNS entfernt werden, war auch deutlich in den *in vivo* Experimenten zu sehen, in denen C57Bl/6 Mäusen eine EAE induziert und anschließend BDNF Lentivirus transduzierte GFP positive MOG-spezifische T-Zellen injiziert wurden. Hier war am Anfang des klinischen Verlaufs noch ein verzögerter und sehr viel milderer EAE-Verlauf der BDNF behandelten Tiere zu erkennen, während dieser nach ca. einer Woche nicht mehr gehalten werden konnte und sich der Grad der Erkrankung immer mehr den Kontrollgruppen näherte. Daraus könnte man schließen, dass die injizierten T-Zellen durch die Apoptose wieder aus dem ZNS entfernt wurden und dass durch die limitierte Zahl der applizierten Zellen der Nachstrom nicht aufrecht erhalten werden konnte, wodurch der positive Effekt auf den klinischen Verlauf abgeklungen ist. Um jedoch diesen milderen Effekt in BDNF behandelten Tieren zu halten wären weitere Injektionen mit den BDNF Lentivirus transduzierten T-Zellen erforderlich, dies wiederum würde aber die Realisierbarkeit der therapeutischen Applikation in Langzeitversuchen limitieren.

Für die i.v. Injektion wurde Tag 7 nach Immunisierung favorisiert. Ein Zeitpunkt an dem die ersten axonalen Schäden in den EAE Läsionen zu erkennen sind (Herrero-Herranz et al., 2008; Jones et al., 2008), aber das initiale T-Zellpriming bereits abgeschlossen ist. Folglich können injizierte T-Zellen direkt ins ZNS zu den Läsionen wandern ohne vorher durch das Immunsystem aktiviert zu werden. Dadurch dienen injizierte Zellen lediglich als Vehikel für die BDNF Expression und tragen nicht weiter zur Entzündung bei. Anders ist es, wenn BDNF zu einem früheren Zeitpunkt appliziert wird, denn dort kann auch die Immunantwort beeinträchtigt werden, so wie es auch der Fall war nach Applikation von BDNF mittels transformierten Knochenmarksstammzellen in EAE induzierten Mäusen (Makar et al., 2009; Makar et al., 2008). Hier beobachtete man, dass die Überexpression des BDNF zu einem verzögerten Einsetzen der EAE führte und den Grad der Erkrankung während der akuten und chronischen Phase vermindern konnte. Zudem wurde in dieser Arbeit nach BDNF Behandlung eine Verschiebung des Lymphozytenphänotyps zum anti-inflammatorischen Phänotyp festgestellt. Dabei geht es darum, dass die Zytokine des Th1 und Th2 Phänotyps scheinbar eine wichtige Funktion in der Läsionsentwicklung in der Pathogenese der MS und EAE einnehmen (Makar et al., 2009; Ruddle et al., 1990). So sezernieren T-Zellen des Th1 Phänotyps wichtige pro-inflammatorische Zytokine wie IFN γ und TNF α und vermitteln somit den inflammatorischen Schaden. Im Gegensatz dazu sezernieren T-Zellen des Th2 Phänotyps z.B. IL-4 und IL-10, die immunsuppressiv und immunregulatorisch wirken und mit dem Nachlassen der Erkrankung und der Genesung in Verbindung gebracht werden (Makar et al., 2009; Ruddle et al., 1990). In diesem Ansatz konnte nun festgestellt werden, dass es in den

BDNF behandelten Tieren zu einer verminderten Expression der pro-inflammatorischen Zytokine (IFN γ und TNF α) kam, während die Expression der anti-inflammatorischen Zytokine (IL-4, IL-10 und IL-11) angestiegen war und somit BDNF nicht nur neuroprotektive Eigenschaften, sondern scheinbar auch immunmodulatorische Fähigkeiten besitzt, sofern der Zeitpunkt der Applikation richtig gewählt wird.

I.v. injizierte Mäuse wurden auf verschiedensten Ebenen immunhistochemisch untersucht. Der im Zusammenhang mit der neuroprotektiven Funktion von BDNF wohl wichtigste Nachweis ist der Erhalt der Axone in BDNF behandelten Tieren, denn das zentrale Merkmal der Multiplen Sklerose, und somit auch seinem Tiermodell der EAE, ist die Demyelinisierung und der axonale Schaden. Bei der Demyelinisierung werden die Myelinscheide und auch die Oligodendrozyten selbst als Folge einer Attacke von Zellen des Immunsystems, die gegen Myelin-ähnliche Epitope gerichtet sind, angegriffen. Diese Immunattacke beinhaltet sowohl eine zelluläre Immunität, mit T-Zellen, die gegen das Myelin oder Oligodendrozyten gerichtet sind, die Phagozytose, die von Makrophagen angetrieben wird und die humorale Immunität, die durch die Sekretion von anti-Myelin Antikörpern durch B-Zellen repräsentiert wird. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten mit denen aktivierte Immunzellen das Myelin und Oligodendrozyten zerstören können. Zum einen kann die direkte Bindung von T-Zellen an die Myelinepitope zur Aktivierung von Makrophagen und somit zur Phagozytose der Myelinscheide kommen. Weiterhin kann die Freisetzung von zytotoxischen Zytokinen oder löslichen toxischen Mediatoren, wie dem Stickstoffmonoxid (NO) sezerniert von Mikroglia bzw. Makrophagen zur Zerstörung des Myelins führen. Oder es sind Antikörper, die gegen ein Myelinepitop gerichtet sind und von infiltrierenden B-Zellen sezerniert werden, die an das Myelin binden und die Komplementkaskade in Gang setzen, was die Opsonisierung und Phagozytose des Myelins und der Oligodendrozyten zur Folge hat. Studien haben ergeben, dass man die Demyelinisierung in der frühen, akuten Phase der MS in unterschiedliche Muster aufteilen kann (Lassmann et al., 2001). Diese Muster konnten zwar in den MS Patienten beobachtet werden, jedoch sind nicht alle vier Muster in den aktiven Läsionen eines einzelnen Patienten detektierbar. Folglich existiert auch nicht ein einziges Tiermodell, welches alle Muster der Demyelinisierung repräsentiert, sondern jedes Tiermodell spiegelt eines der vier Muster wieder. Das erste Muster ist charakterisiert durch den T-Zell/Makrophagen-assoziierten Myelinschaden und wird hauptsächlich im MOG₃₅₋₅₅-EAE Modell in C57BL/6 Mäusen beobachtet (Calida et al., 2001). Das Hauptcharakteristikum des zweiten Musters ist die Präzipitation von Immunglobulinen und des Komplementsystems an den Stellen des aktiven Myelinabbaus. Das dritte Muster spiegelt die Zeichen einer

Oligodendrozyten Dystrophie wieder mit einem unverhältnismäßigen Verlust an dem Myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG) und der Apoptose der Oligodendrozyten (Aboul-Enein et al., 2003). Das vierte Muster ist hauptsächlich gekennzeichnet durch die Degeneration der Oligodendrozyten. Neben der Demyelinisierung ist auch der axonale Schaden und Verlust ein charakteristisches Merkmal der MS. Der axonale Schaden wird durch histologische Untersuchungen bestimmt, wobei die Akkumulation des *Amyloid Precursor Proteins* (APP) eine beliebte Methode ist, um den Schaden zu detektieren. Die Akkumulation des APP entsteht, wenn der axonale Transport dieses Proteins durch eine Verletzung unterbrochen ist. APP Akkumulation ist eine transiente Erscheinung, die meist in der frühen Phase der Erkrankung auftaucht und mit dem Ausmaß der Infiltration korreliert (Kuhlmann et al., 2002). Es konnte in *in vitro* Studien gezeigt werden, dass auch CD8⁺ T-Zellen direkt mit den demyelinisierten Axonen interagieren können und axonalen Schaden vermitteln (Medana et al., 2001). Auch in einer *in vivo* Studie führte der adoptive Transfer von CD8⁺ T-Zellen zu entzündlichen Gehirnläsionen mit einem hohen Maß an axonalem Schaden und Zerstörung (Huseby et al., 2001), auch wenn diese T-Zellen eigentlich gegen ein Myelinantigen und nicht gegen ein axonales Antigen gerichtet waren. Im Gegensatz dazu wurde aber auch gezeigt, dass in Mäusen, in denen die MHC Klasse-1 und CD8⁺ Interaktion gestört war, ein sehr viel höheres Maß an axonalem Schaden auftrat (Linker et al., 2005). Ein weiterer Mediator, der zum axonalen Schaden beiträgt, ist das Stickstoffmonoxid (NO), welches von aktivierten Makrophagen sezerniert wird und eine reversible Blockierung der Leitung in den demyelinisierten Axonen verursacht (Redford et al., 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass NO Exposition mit Konzentrationen ähnlich denen, die von Makrophagen produziert werden, zu einer Wallerschen Degeneration der Axone führt, dessen Schädigung in einer Durchtrennung des Axons endete (Smith et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht den axonalen Schaden mit Hilfe der Versilberung nach Bielschowsky zu bestimmen. Diese Methode färbt spezifisch Axone an und konnte auf signifikante Art und Weise zeigen, dass die Axone in den Läsionen der BDNF behandelten Tiere deutlich besser erhalten waren. Dies lässt darauf schließen, dass die BDNF Überexpression entweder die Axone direkt vor Schädigung geschützt hat, da bereits berichtet wurde, dass das von T-Zellen exprimierte BDNF und sein spezifischer Rezeptor TrkB in den Axonen der entzündlichen Läsionen überexprimiert sind (Stadelmann et al., 2002). Somit kann das BDNF *in situ* direkt auf Neuronen wirken, indem es benefizielle Mechanismen in Gang setzt, die den schädlichen Effekten der Neuroinflammation entgegenwirken können. Oder aber die BDNF Überexpression in den transduzierten T-Zellen könnte zu einer

Remyelinisierung geführt haben, denn es konnte auch gezeigt werden, dass die Applikation von BDNF in einem Modell der Rückenmarksverletzung zu einer verstärkten Proliferation der Oligodendrozyten und Remyelinisierung von Axonen geführt hat (McTigue et al., 1998).

Diese Daten wurden durch die APP Färbung unterstützt, dessen Akkumulation ein Hinweis auf axonalen Schaden ist (Bramlett et al., 1997; Li et al., 1995; Pesini et al., 1999; Yam et al., 1997) und in den BDNF behandelten Tieren ebenfalls reduziert auftritt. Ein größerer signifikanter Unterschied ist wohl aus dem Grund nicht detektierbar, da die Analyse der Rückenmarksschnitte erst in der chronischen Phase durchgeführt wurde und APP Akkumulation in der akuten Phase am höchsten ist und mit der Zeit abnimmt (Kuhlmann et al., 2002).

Axonaler Schaden wird, wie bereits aufgeführt, auch besonders durch die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) begünstigt (MacMicking et al., 1997). In entzündlichen Läsionen sind es Makrophagen und Mikroglia, die durch die Expression der induzierbaren NO Synthetase (iNOS) vermehrt NO produzieren und dadurch Axone angreifen. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die iNOS Expression in den BDNF behandelten Tieren auf signifikante Art und Weise um die Hälfte reduziert war und korrelierte damit gut mit den Daten des axonalen Schadens. Die Zielzellen, in denen die iNOS Expression reduziert ist, scheinen hierbei jedoch nicht die Makrophagen zu sein, da bereits gezeigt wurde das BDNF keinen Einfluss auf die NO Produktion in Makrophagen hat (Barouch et al., 2001). Aber es wurde veröffentlicht, dass die NO Produktion in Mikroglia durch BDNF reduziert wird und somit die Reduktion der iNOS Expression womöglich in Mikroglia stattfand (Nakajima et al., 2001). Eine eindeutige Zuweisung kann jedoch nicht getroffen werden, da mit der histologischen Färbung nicht zwischen den beiden Zelltypen unterschieden werden kann.

Die Inflammation hingegen wurde durch die BDNF Überexpression nicht beeinflusst und zeigte in den immunhistochemischen Untersuchungen die gleiche Anzahl an T-Zell- und Makrophageninfiltrationen in den BDNF bzw. GFP behandelten Mäusen. Für die Charakterisierung der infiltrierenden T-Zellen vor allem aber auch der injizierten mit den Lentiviren transduzierten MOG-spezifischen GFP positiven T-Zellen wurde deren Aktivierungsstatus nach typischen T-Zell-Aktivierungsmarkern hin untersucht. Dafür wurden die aus dem Rückenmark isolierten Lymphozyten mit den Lymphozyten der Milz verglichen. Es war deutlich zu erkennen, dass der frühe Aktivierungsmarker CD25 und der späte Memory Zellmarker CD44 in den transduzierten T-Zellen im Rückenmark runterreguliert war, wodurch eine aggressive Effektorfunktion der injizierten Zellen eher unwahrscheinlich

erscheint. Im Fall von CD62L zeigten die Vergleichsgruppen keine sehr großen Unterschiede untereinander. Da aber CD62L ein Adhäsionsmolekül ist, welches für das Homing der T-Zellen verantwortlich ist, ist die Expression dieses Moleküls womöglich nötig, um den injizierten transduzierten T-Zellen, die durch das Immunsystem nicht wie die endogenen Effektorzellen aktiviert werden, das Eindringen in das entzündete Gewebe zu ermöglichen. Eine interessante Aussage ergab sich bei der Analyse der CD69 Expression. In diesem Fall zeigten die transduzierten T-Zellen eine sehr viel stärkere Expression dieses Moleküls sowohl in der Milz als auch im Rückenmark. CD69 ist eins der am frühesten exprimierten Lymphozyten Aktivierungsmarker und wurde in früheren Studien als pro-inflammatorischer Rezeptor deklariert (Testi et al., 1990). Dennoch wurden keine fundierten *in vivo* Experimente durchgeführt, um die genaue Rolle und die physiologische Funktion des CD69 im Immunsystem zu untersuchen. Neuere Studien hingegen zeigen, dass dem CD69 auch eine regulatorische Funktion zugesprochen werden kann. Diese regulatorische Funktion kann hauptsächlich durch die Produktion von TGF- β vermittelt werden. Dieses Molekül reguliert die Funktion der Antigenpräsentierenden Zellen (APC) herunter (Kulkarni et al., 1993; Shull et al., 1992) und limitiert die Aktivierung und die Polarisation der T-Zellen zum Th1 bzw. Th2 Phänotyp. Außerdem ist TGF- β ein Überlebensfaktor für natürlich vorkommende Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen und eine zentrale Komponente für deren suppressive Aktivität, vor allem durch die Suppression der IFN- γ Antwort (Karpus and Swanborg, 1991), *in vivo* (Marie et al., 2005). Die signifikant höhere CD69 Expression in unseren transduzierten Zellen könnte ebenfalls keine pro-inflammatorischen Ereignisse induzieren, da sich schließlich auch der Krankheitsverlauf der EAE nicht nach Injektion der transduzierten T-Zellen verschlimmerte. Es könnte sogar sein, dass durch die erhöhte CD69 Expression die Expansion von regulatorischen T-Zellen ausgelöst wurde, die bekanntermaßen eine suppressive Funktion in autoimmunen Erkrankungen haben (Kim et al., 2007; Sakaguchi, 2005).

Um die BDNF Überexpression *in vivo* zu detektieren, wurde versucht den BDNF spezifischen TrkB Rezeptor in den Rückenmarksquerschnitten der behandelten Tiere nachzuweisen. Dieser Rezeptor wird nach Bindung mit seinem Liganden phosphoryliert (Kaplan et al., 1991). Dieser phosphorylierte Rezeptor (pTrkB) kann anschließend mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden und die Überexpression des BDNF Proteins nachweisen. Die Ergebnisse zeigten, dass die pTrkB Expression zunächst lediglich auf die Läsionen beschränkt war, die durch die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen charakterisiert wird. Des Weiteren führte die Injektion der BDNF überexprimierenden MOG-spezifischen TZR

transgenen T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer vermehrten Expression des pTrkB in den Läsionen. Dadurch wurde erneut die Funktionalität des Systems *in vivo* bestätigt, da TrkB vermutlich in den Läsionen durch die BDNF überexprimierenden T-Zellen aktiviert wurde, was wiederum die Wirksamkeit von BDNF direkt vor Ort nachweisen würde. Da kaum eine Colokalisation der T-Zellen mit pTrkB beobachtet werden konnte, scheint BDNF in diesem Fall nicht auf autokrine Art und Weise sezerniert zu werden. Das bedeutet, dass die BDNF Überexpression scheinbar nicht die T-Zellen selbst beeinflusst, auch Makrophagen und Mikroglia scheinen in diesem Ansatz nicht die Zielzellen von BDNF zu sein. Da aber ein neuroprotektiver Effekt erzielt werden konnte, könnte BDNF direkt auf die Axone wirken, da bereits durch Andere (Meyer-Franke et al., 1998) und auch durch die eigene Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (Daten noch nicht veröffentlicht), dass der BDNF spezifischen TrkB Rezeptor auch auf Axonen exprimiert wird.

Abschließend ist zu sagen, dass diese Ergebnisse ganz deutlich eine funktionelle Rolle des BDNF in der EAE aufzeigen konnten. Der genaue Wirkmechanismus ist zwar nicht bekannt, aber es konnten verschiedene Ansatzpunkte, wie dem direkten Einfluss des BDNF auf Axone über die TrkB Rezeptoren oder dem indirekten Einfluss über die Runterregulierung von iNOS in Mikroglia bzw. der Expansion von regulatorischen T-Zellen, vorgeschlagen werden. Außerdem geben diese Daten, die die neuroprotektive Funktion des BDNF in der EAE darstellen konnten, Hoffnung für die weitere Erforschung der Therapeutika, die in der Multiplen Sklerose bzw. der autoimmunen Demyelinisierung des ZNS die BDNF Expression hochregulieren können.

6. Zusammenfassung

Das Neurotrophin *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF) ist essenziell für die Entwicklung und den Erhalt des Nervensystems. Seine Expression ist nicht nur auf Neuronen begrenzt, sondern wurde auch in Immunzellen, wie z.B. in den Infiltraten in Multiple Sklerose Läsionen, detektiert. Zahlreiche Studien deuten auf eine neuroprotektive Funktion des BDNF hin. Dass Immunzellen BDNF exprimieren, welches zudem neuroprotektiv wirken könnte wurde auch im „Konzept der neuroprotektiven Autoimmunität“ aufgegriffen. Dieses Konzept baut darauf auf, dass autoimmune T-Zellen neben ihrer aggressiv destruktiven Funktion durch die Expression von regulatorischen Molekülen, wie z.B. auch dem BDNF, axonprotektive Fähigkeiten besitzen. Ausgehend von dieser Hypothese wurde das BDNF in der vorliegenden Arbeit auf zwei verschiedenen Wegen untersucht.

Im Ersten Teil standen grundlagenorientierte Untersuchungen im Vordergrund. Dabei ging es um die Erforschung der unterschiedlichen *Splice*-Varianten des BDNF Gens und deren Expressionsmuster im ZNS und in den Immunzellen. Es wurden insgesamt neun verschiedene *Splice*-Varianten für BDNF beschrieben, die sich in ihrer Promoterregion, aber nicht in der Protein-kodierenden Sequenz unterscheiden. Real-Time Untersuchungen der mRNA ergaben, dass im Mausgehirn alle existierenden *Splice*-Varianten exprimiert werden, während in peripheren lymphatischen Organen (Thymus, Milz, Lymphknoten) und aufgereinigten Immunzellen (T-Zellen, Makrophagen) lediglich die *Splice*-Variante mBDNF 3 nachgewiesen werden konnte. Nach Stimulation der T-Zellen wurde die BDNF 3 mRNA hochreguliert, während es in Makrophagen nach Stimulation zu einer Verringerung der BDNF 3 mRNA kam. Eine weitere detaillierte Analyse von differenzierten Zellpopulationen aus dem Gehirn ergab, dass gereinigte Mikroglia wie Makrophagen nur mBDNF 3 exprimieren, während in gereinigten Astrozyten alle *Splice*-Varianten, ähnlich dem Gesamthirn, nachweisbar sind.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von BDNF *Splice*-Varianten zwischen Immunsystem und Gehirn signifikant unterscheidet. Dabei scheinen unterschiedliche Regulationsmechanismen der BDNF mRNA Expression in den verschiedenen Zelltypen zu existieren. Die physiologische Relevanz dieser *Splice*-Varianten ist jedoch immer noch nicht aufgeklärt.

Im zweiten Teil der Arbeit ging es um die Überexpression von BDNF in T-Zellen und anschließendem adoptiven Transfer in einem Tiermodell der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Dadurch sollte getestet werden, ob diese Injektion den Krankheitsverlauf, aber vor allem den axonalen Schaden positiv beeinflussen kann und somit

die Hypothese unterstützt, dass BDNF in der EAE neuroprotektiv wirkt und eventuell als potentieller Therapieansatz in Frage kommt. Dafür wurde die codierende murine BDNF Gensequenz in ein lentivirales Transfektionssystem inkloniert. Dieses lentivirale System wurde erfolgreich zur Generierung von BDNF überexprimierenden MOG-spezifische T-Zellrezeptor (TZR) transgenen T-Zellen verwendet, die zusätzlich GFP als Transgen ubiquitär exprimieren. Diese Lentivirus transduzierten T-Zellen wurden in C57BL/6 Mäuse i.v. injiziert, in denen zuvor eine EAE ausgelöst wurde. Die mit den BDNF transduzierten T-Zellen behandelten Tiere zeigten zunächst einen verzögerten und deutlich reduzierten Krankheitsverlauf, der sich jedoch allmählich den Kontrollgruppen näherte. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten keinen Unterschied in der Infiltration von T-Zellen und Makrophagen zwischen den beiden Versuchsgruppen. Der Aktivierungsstatus, der die CD25 und CD44 Expression betrifft, war in den injizierten T-Zellen im Vergleich zu den endogenen T-Zellen aus dem ZNS runterreguliert. Die Charakterisierung des axonalen Schadens zeigte geringere APP Akkumulationen und höhere Axondichte in den Läsionen und Periläsionen der BDNF behandelten Tieren im Vergleich zu den GFP behandelten Kontrolltieren, was einen besseren Axonerhalt in den BDNF behandelten Tieren bezeugte. Ein Effektormolekül, das für die Entstehung des axonalen Schadens mitverantwortlich gemacht wird, ist die induzierbare NO-Synthetase (iNOS), die auch in den BDNF behandelten Mäusen signifikant geringer exprimiert war. Auch die Signaltransduktionswege des BDNF wurden immunhistochemisch untersucht. Dafür wurde der aktivierte BDNF spezifische Rezeptor TrkB (phospho TrkB) in den beiden Vergleichsgruppen angefärbt. Das Ergebnis zeigte ein sehr viel stärkeres Signal in den BDNF behandelten Tieren und die Expression war lediglich auf die Läsionen, die durch die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen gekennzeichnet waren, begrenzt. Dies bestätigte nochmals die Funktionalität des Systems *in vivo*, da wahrscheinlich der TrkB Rezeptor durch die BDNF Überexpression aktiviert wurde und somit auch einen Nachweis für die Wirksamkeit von BDNF direkt vor Ort lieferte.

Die Überexpression von BDNF in T-Zellen sorgte *in vivo* ganz deutlich für einen besseren Axonerhalt und bestätigte damit seine funktionelle Relevanz in der EAE. Durch diese Ergebnisse wird das Neurotrophin BDNF in den Focus neuer Therapiestrategien der Multiplen Sklerose und anderer Autoimmunerkrankungen gesetzt.

7. Literaturverzeichnis

1999. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* 52, 1427-1433.
- Aboul-Enein, F., Bauer, J., Klein, M., Schubart, A., Flugel, A., Ritter, T., Kawakami, N., Siedler, F., Linington, C., Wekerle, H., Lassmann, H., Bradl, M., 2004. Selective and antigen-dependent effects of myelin degeneration on central nervous system inflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 1284-1296.
- Aboul-Enein, F., Rauschka, H., Kornek, B., Stadelmann, C., Stefferl, A., Bruck, W., Lucchinetti, C., Schmidbauer, M., Jellinger, K., Lassmann, H., 2003. Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 25-33.
- Abramchik, G.V., Yermakova, S.S., Kaliunov, V.N., Tanina, R.M., Tumilovich, M.K., 1988. The immunomodulatory effect of nerve growth factor. *J Neurosci Res* 19, 349-356.
- Adler, R., Landa, K.B., Manthorpe, M., Varon, S., 1979. Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 204, 1434-1436.
- Agnello, D., Bigini, P., Villa, P., Mennini, T., Cerami, A., Brines, M.L., Ghezzi, P., 2002. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 952, 128-134.
- Allen, S.J., Wilcock, G.K., Dawbarn, D., 1999. Profound and selective loss of catalytic TrkB immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 648-651.
- Aloe, L., Simone, M.D., Properzi, F., 1999. Nerve growth factor: a neurotrophin with activity on cells of the immune system. *Microsc Res Tech* 45, 285-291.
- Aloe, L., Tuveri, M.A., 1997. Nerve growth factor and autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 15, 433-438.
- Altieri, M., Marini, F., Arban, R., Vitulli, G., Jansson, B.O., 2004. Expression analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA isoforms after chronic and acute antidepressant treatment. *Brain Res* 1000, 148-155.
- Ambrosini, E., Aloisi, F., 2004. Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res* 29, 1017-1038.
- Aoyama, M., Asai, K., Shishikura, T., Kawamoto, T., Miyachi, T., Yokoi, T., Togari, H., Wada, Y., Kato, T., Nakagawara, A., 2001. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett* 164, 51-60.
- Arakawa, Y., Sendtner, M., Thoenen, H., 1990. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci* 10, 3507-3515.
- Barde, Y.A., Edgar, D., Thoenen, H., 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* 1, 549-553.
- Baron, J.L., Madri, J.A., Ruddle, N.H., Hashim, G., Janeway, C.A., Jr., 1993. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* 177, 57-68.
- Barouch, R., Appel, E., Kazimirsky, G., Brodie, C., 2001. Macrophages express neurotrophins and neurotrophin receptors. Regulation of nitric oxide production by NT-3. *J Neuroimmunol* 112, 72-77.
- Baumann, J.G., Unutmaz, D., Miller, M.D., Breun, S.K., Grill, S.M., Mirro, J., Littman, D.R., Rein, A., KewalRamani, V.N., 2004. Murine T cells potently restrict human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 78, 12537-12547.

- Bayas, A., Kruse, N., Moriabadi, N.F., Weber, F., Hummel, V., Wohleben, G., Gold, R., Toyka, K.V., Rieckmann, P., 2003. Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells. *Neurosci Lett* 335, 155-158.
- Bentley, C.A., Lee, K.F., 2000. p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *J Neurosci* 20, 7706-7715.
- Berg, M.M., Sternberg, D.W., Parada, L.F., Chao, M.V., 1992. K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity. *J Biol Chem* 267, 13-16.
- Besser, M., Wank, R., 1999. Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J Immunol* 162, 6303-6306.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H.L., Linington, C., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K., 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 197, 1073-1081.
- Bieniasz, P.D., Fridell, R.A., Anthony, K., Cullen, B.R., 1997. Murine CXCR-4 is a functional coreceptor for T-cell-tropic and dual-tropic strains of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71, 7097-7100.
- Bishop, J.F., Mueller, G.P., Mouradian, M.M., 1994. Alternate 5' exons in the rat brain-derived neurotrophic factor gene: differential patterns of expression across brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 26, 225-232.
- Bothwell, M., 1995. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 18, 223-253.
- Bramlett, H.M., Kraydieh, S., Green, E.J., Dietrich, W.D., 1997. Temporal and regional patterns of axonal damage following traumatic brain injury: a beta-amyloid precursor protein immunocytochemical study in rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 1132-1141.
- Braun, A., Lommatzsch, M., Mannsfeldt, A., Neuhaus-Steinmetz, U., Fischer, A., Schnoy, N., Lewin, G.R., Renz, H., 1999. Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21, 537-546.
- Bravo, J., Heath, J.K., 2000. Receptor recognition by gp130 cytokines. *Embo J* 19, 2399-2411.
- Brodie, C., Oshiba, A., Renz, H., Bradley, K., Gelfand, E.W., 1996. Nerve growth-factor and anti-CD40 provide opposite signals for the production of IgE in interleukin-4-treated lymphocytes. *Eur J Immunol* 26, 171-178.
- Browning, J., Horner, J.W., Pettoello-Mantovani, M., Raker, C., Yurasov, S., DePinho, R.A., Goldstein, H., 1997. Mice transgenic for human CD4 and CCR5 are susceptible to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14637-14641.
- Byram, S.C., Carson, M.J., DeBoy, C.A., Serpe, C.J., Sanders, V.M., Jones, K.J., 2004. CD4-positive T cell-mediated neuroprotection requires dual compartment antigen presentation. *J Neurosci* 24, 4333-4339.
- Calida, D.M., Constantinescu, C., Purev, E., Zhang, G.X., Ventura, E.S., Lavi, E., Rostami, A., 2001. Cutting edge: C3, a key component of complement activation, is not required for the development of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Immunol* 166, 723-726.
- Caroleo, M.C., Costa, N., Bracci-Laudiero, L., Aloe, L., 2001. Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. *J Neuroimmunol* 113, 193-201.

- Carroll, P., Lewin, G.R., Koltzenburg, M., Toyka, K.V., Thoenen, H., 1998. A role for BDNF in mechanosensation. *Nat Neurosci* 1, 42-46.
- Chao, M.V., Bothwell, M., 2002. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 33, 9-12.
- Charo, I.F., Ransohoff, R.M., 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354, 610-621.
- Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R., Greenberg, M.E., 2003. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302, 885-889.
- Ciriaco, E., Dall'Aglio, C., Hannestad, J., Huerta, J.J., Laura, R., Germana, G., Vega, J.A., 1996. Localization of Trk neurotrophin receptor-like proteins in avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *J Neuroimmunol* 69, 73-83.
- Comi, G., Pulizzi, A., Rovaris, M., Abramsky, O., Arbizu, T., Boiko, A., Gold, R., Havrdova, E., Komoly, S., Selmaj, K., Sharrack, B., Filippi, M., 2008. Effect of laquinimod on MRI-monitored disease activity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet* 371, 2085-2092.
- Connor, B., Young, D., Yan, Q., Faull, R.L., Synek, B., Dragunow, M., 1997. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 49, 71-81.
- Costello, E., Munoz, M., Buetti, E., Meylan, P.R., Diggelmann, H., Thali, M., 2000. Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther* 7, 596-604.
- Craner, M.J., Damarjian, T.G., Liu, S., Hains, B.C., Lo, A.C., Black, J.A., Newcombe, J., Cuzner, M.L., Waxman, S.G., 2005. Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS. *Glia* 49, 220-229.
- Curtis, R., Adryan, K.M., Zhu, Y., Harkness, P.J., Lindsay, R.M., DiStefano, P.S., 1993. Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. *Nature* 365, 253-255.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., Khoury, S., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 9, 1347-1355.
- Davies, P., Maloney, A.J., 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.
- Dello Russo, C., Gavrilyuk, V., Weinberg, G., Almeida, A., Bolanos, J.P., Palmer, J., Pelligrino, D., Galea, E., Feinstein, D.L., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma thiazolidinedione agonists increase glucose metabolism in astrocytes. *J Biol Chem* 278, 5828-5836.
- Dittrich, F., Ochs, G., Grosse-Wilde, A., Berweiler, U., Yan, Q., Miller, J.A., Toyka, K.V., Sendtner, M., 1996. Pharmacokinetics of intrathecally applied BDNF and effects on spinal motoneurons. *Exp Neurol* 141, 225-239.
- D'Onofrio, M., de Grazia, U., Morrone, S., Cuomo, L., Spinsanti, P., Frati, L., Gulino, A., Ragona, G., 2000. Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 11, 283-291.
- D'Souza, S.D., Alinauskas, K.A., Antel, J.P., 1996. Ciliary neurotrophic factor selectively protects human oligodendrocytes from tumor necrosis factor-mediated injury. *J Neurosci Res* 43, 289-298.
- Ehrenreich, H., Aust, C., Krampe, H., Jahn, H., Jacob, S., Herrmann, M., Siren, A.L., 2004. Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metab Brain Dis* 19, 195-206.

- Ehrhard, P.B., Erb, P., Graumann, U., Otten, U., 1993. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10984-10988.
- Ehrhard, P.B., Erb, P., Graumann, U., Schmutz, B., Otten, U., 1994. Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation. *J Immunol* 152, 2705-2709.
- Ehrhard, P.B., Ganter, U., Stalder, A., Bauer, J., Otten, U., 1993a. Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5423-5427.
- Eide, F.F., Vining, E.R., Eide, B.L., Zang, K., Wang, X.Y., Reichardt, L.F., 1996. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 16, 3123-3129.
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E.M., Black, I.B., 1996. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16, 2508-2521.
- Elliott, E., Atlas, R., Lange, A., Ginzburg, I., 2005. Brain-derived neurotrophic factor induces a rapid dephosphorylation of tau protein through a PI-3 Kinase signalling mechanism. *Eur J Neurosci* 22, 1081-1089.
- Ernfors, P., Lee, K.F., Jaenisch, R., 1994. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368, 147-150.
- Esposito, D., Patel, P., Stephens, R.M., Perez, P., Chao, M.V., Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., 2001. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* 276, 32687-32695.
- Felts, P.A., Smith, K.J., Gregson, N.A., Hughes, R.A., 2002. Brain-derived neurotrophic factor in experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol* 124, 62-69.
- Ferrer, I., Marin, C., Rey, M.J., Ribalta, T., Goutan, E., Blanco, R., Tolosa, E., Marti, E., 1999. BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 729-739.
- Fridmacher, V., Kaltschmidt, B., Goudeau, B., Ndiaye, D., Rossi, F.M., Pfeiffer, J., Kaltschmidt, C., Israel, A., Memet, S., 2003. Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J Neurosci* 23, 9403-9408.
- Friese, M.A., Fugger, L., 2005. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* 128, 1747-1763.
- Frim, D.M., Uhler, T.A., Galpern, W.R., Beal, M.F., Breakefield, X.O., Isacson, O., 1994. Implanted fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5104-5108.
- Frohman, E.M., Racke, M.K., Raine, C.S., 2006. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354, 942-955.
- Garcia-Suarez, O., Blanco-Gelaz, M.A., Lopez, M.L., Germana, A., Cabo, R., Diaz-Esnal, B., Silos-Santiago, I., Ciriaco, E., Vega, J.A., 2002. Massive lymphocyte apoptosis in the thymus of functionally deficient TrkB mice. *J Neuroimmunol* 129, 25-34.
- Garcia-Suarez, O., Germana, A., Hannestad, J., Ciriaco, E., Silos-Santiago, I., Germana, G., Vega, J.A., 2001. Involvement of the NGF receptors (Trka and p75^{Ngfr}) in the development and maintenance of the thymus. *Ital J Anat Embryol* 106, 279-285.
- Garzon, D., Yu, G., Fahnstock, M., 2002. A new brain-derived neurotrophic factor transcript and decrease in brain-derived neurotrophic factor transcripts 1, 2 and 3 in Alzheimer's disease parietal cortex. *J Neurochem* 82, 1058-1064.
- Genc, K., Genc, S., Baskin, H., Semin, I., 2006. Erythropoietin decreases cytotoxicity and nitric oxide formation induced by inflammatory stimuli in rat oligodendrocytes. *Physiol Res* 55, 33-38.

- Genc, S., Koroglu, T.F., Genc, K., 2004. Erythropoietin as a novel neuroprotectant. *Restor Neurol Neurosci* 22, 105-119.
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., Lecesne, A., Robert, C., Blay, J.Y., Bernard, J., Caillat-Zucman, S., Freitas, A., Tursz, T., Wagner-Ballon, O., Capron, C., Vainchenker, W., Martin, F., Zitvogel, L., 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202, 1075-1085.
- Gold, R., Linington, C., Lassmann, H., 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953-1971.
- Gorski, J.A., Balogh, S.A., Wehner, J.M., Jones, K.R., 2003. Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Neuroscience* 121, 341-354.
- Gotz, R., Koster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharl, M., Thoenen, H., 1994. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372, 266-269.
- Gravel, C., Gotz, R., Lorrain, A., Sendtner, M., 1997. Adenoviral gene transfer of ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor leads to long-term survival of axotomized motor neurons. *Nat Med* 3, 765-770.
- Green, D.R., Droin, N., Pinkoski, M., 2003. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193, 70-81.
- Haas, J., Hug, A., Viehover, A., Fritzsching, B., Falk, C.S., Filser, A., Vetter, T., Milkova, L., Korporal, M., Fritz, B., Storch-Hagenlocher, B., Krammer, P.H., Suri-Payer, E., Wildemann, B., 2005. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 35, 3343-3352.
- Hafler, D.A., 2004. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 113, 788-794.
- Hagg, T., Varon, S., Louis, J.C., 1993. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) promotes low-affinity nerve growth factor receptor and CD4 expression by rat CNS microglia. *J Neuroimmunol* 48, 177-187.
- Hallbook, F., 1999. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol* 9, 616-621.
- Hammarberg, H., Lidman, O., Lundberg, C., Eltayeb, S.Y., Gielen, A.W., Muhallab, S., Svenningsson, A., Linda, H., van Der Meide, P.H., Cullheim, S., Olsson, T., Piehl, F., 2000. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci* 20, 5283-5291.
- Hannestad, J., Garcia-Suarez, O., Huerta, J.J., Esteban, I., Naves, F.J., Vega, J.A., 1997. TrkA neurotrophin receptor protein in the rat and human thymus. *Anat Rec* 249, 373-379.
- Hannestad, J., Marino, F., Germana, A., Catania, S., Abbate, F., Ciriaco, E., Vega, J.A., 2000. Trk neurotrophin receptor-like proteins in the teleost *Dicentrarchus labrax*. *Cell Tissue Res* 300, 1-9.
- Hauben, E., Butovsky, O., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., Leibowitz-Amit, R., Pevsner, E., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, I.R., Schwartz, M., 2000. Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J Neurosci* 20, 6421-6430.
- Hauser, S.L., Oksenberg, J.R., 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 52, 61-76.
- Hellweg, R., Jockers-Scherubl, M., 1994. Neurotrophic factors in memory disorders. *Life Sci* 55, 2165-2169.

- Hemmer, B., Archelos, J.J., Hartung, H.P., 2002. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3, 291-301.
- Hemmer, B., Nessler, S., Zhou, D., Kieseier, B., Hartung, H.P., 2006. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 201-211.
- Hempstead, B.L., 2002. The many faces of p75^{NTR}. *Curr Opin Neurobiol* 12, 260-267.
- Herman, A.E., Freeman, G.J., Mathis, D., Benoist, C., 2004. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med* 199, 1479-1489.
- Herrero-Herranz, E., Pardo, L.A., Gold, R., Linker, R.A., 2008. Pattern of axonal injury in murine myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 30, 162-173.
- Hildeman, D.A., Zhu, Y., Mitchell, T.C., Kappler, J., Marrack, P., 2002. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol* 14, 354-359.
- Hilton, D.J., Nicola, N.A., Metcalf, D., 1988. Specific binding of murine leukemia inhibitory factor to normal and leukemic monocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5971-5975.
- Hilton, D.J., Nicola, N.A., Metcalf, D., 1991. Distribution and comparison of receptors for leukemia inhibitory factor on murine hemopoietic and hepatic cells. *J Cell Physiol* 146, 207-215.
- Hock, C., Heese, K., Hulette, C., Rosenberg, C., Otten, U., 2000. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol* 57, 846-851.
- Hohlfeld, R., 1997. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 120 (Pt 5), 865-916.
- Hohlfeld, R., Kerschensteiner, M., Stadelmann, C., Lassmann, H., Wekerle, H., 2000. The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 107, 161-166.
- Holsinger, R.M., Schnarr, J., Henry, P., Castelo, V.T., Fahnstock, M., 2000. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 347-354.
- Howells, D.W., Porritt, M.J., Wong, J.Y., Batchelor, P.E., Kalnins, R., Hughes, A.J., Donnan, G.A., 2000. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol* 166, 127-135.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677-736.
- Huang, R., Huang, J., Cathcart, H., Smith, S., Poduslo, S.E., 2007. Genetic variants in brain-derived neurotrophic factor associated with Alzheimer's disease. *J Med Genet* 44, e66.
- Huseby, E.S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlen, C., Goverman, J., 2001. A pathogenic role for myelin-specific CD8⁽⁺⁾ T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 194, 669-676.
- Ip, N.Y., Ibanez, C.F., Nye, S.H., McClain, J., Jones, P.F., Gies, D.R., Belluscio, L., Le Beau, M.M., Espinosa, R., 3rd, Squinto, S.P., et al., 1992. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3060-3064.
- Ip, N.Y., Yancopoulos, G.D., 1994. Neurotrophic factor receptors: just like other growth factor and cytokine receptors? *Curr Opin Neurobiol* 4, 400-405.
- Jack, C., Ruffini, F., Bar-Or, A., Antel, J.P., 2005. Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 81, 363-373.

- Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E., Kuchroo, V.K., 2009. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 183, 7169-7177.
- Jones, M.V., Nguyen, T.T., Deboy, C.A., Griffin, J.W., Whartenby, K.A., Kerr, D.A., Calabresi, P.A., 2008. Behavioral and pathological outcomes in MOG 35-55 experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 199, 83-93.
- Jones, T.B., Basso, D.M., Sodhi, A., Pan, J.Z., Hart, R.P., MacCallum, R.C., Lee, S., Whitacre, C.C., Popovich, P.G., 2002. Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *J Neurosci* 22, 2690-2700.
- Jordan, F.L., Thomas, W.E., 1988. Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res* 472, 165-178.
- Kahn, M.A., Ellison, J.A., Speight, G.J., de Vellis, J., 1995. CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res* 685, 55-67.
- Kaltschmidt, B., Ndiaye, D., Korte, M., Pothion, S., Arbibe, L., Prullage, M., Pfeiffer, J., Lindecke, A., Staiger, V., Israel, A., Kaltschmidt, C., Memet, S., 2006. NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol* 26, 2936-2946.
- Kaplan, D.R., Martin-Zanca, D., Parada, L.F., 1991. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350, 158-160.
- Karpus, W.J., Swanborg, R.H., 1991. CD4+ suppressor cells inhibit the function of effector cells of experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism involving transforming growth factor-beta. *J Immunol* 146, 1163-1168.
- Katoh-Semba, R., Kaisho, Y., Shintani, A., Nagahama, M., Kato, K., 1996. Tissue distribution and immunocytochemical localization of neurotrophin-3 in the brain and peripheral tissues of rats. *J Neurochem* 66, 330-337.
- Katoh-Semba, R., Semba, R., Kashiwamata, S., Kato, K., 1993. An acceleration of age-related increases in levels of the beta-subunit of nerve growth factor in selected tissues from senescence-accelerated mice (SAM-P/8). *J Mol Neurosci* 4, 107-115.
- Keegan, B.M., Noseworthy, J.H., 2002. Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 53, 285-302.
- Kernie, S.G., Liebl, D.J., Parada, L.F., 2000. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *Embo J* 19, 1290-1300.
- Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V.V., Misgeld, T., Klinkert, W.E., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R.L., Bartke, I., Stadelmann, C., Lassmann, H., Wekerle, H., Hohlfeld, R., 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.
- Kerschensteiner, M., Stadelmann, C., Dechant, G., Wekerle, H., Hohlfeld, R., 2003. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol* 53, 292-304.
- Kim, D.H., Jahng, T.A., 2004. Continuous brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion after methylprednisolone treatment in severe spinal cord injury. *J Korean Med Sci* 19, 113-122.
- Kim, J.M., Rasmussen, J.P., Rudensky, A.Y., 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 8, 191-197.
- Kipnis, J., Mizrahi, T., Hauben, E., Shaked, I., Shevach, E., Schwartz, M., 2002. Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15620-15625.

- Kittur, S.D., Song, L., Endo, H., Adler, W.H., 1992. Nerve growth factor receptor gene expression in human peripheral blood lymphocytes in aging. *J Neurosci Res* 32, 444-448.
- Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Barbacid, M., 1991a. The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65, 189-197.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S.A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., Barbacid, M., 1991b. The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395-403.
- Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Tyler, K.L., 2005. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 353, 369-374.
- Kobayashi, N.R., Fan, D.P., Giehl, K.M., Bedard, A.M., Wiegand, S.J., Tetzlaff, W., 1997. BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and α -tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci* 17, 9583-9595.
- Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., Miller, S.D., 2002. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 169, 4712-4716.
- Koizumi, S., Contreras, M.L., Matsuda, Y., Hama, T., Lazarovici, P., Guroff, G., 1988. K-252a: a specific inhibitor of the action of nerve growth factor on PC 12 cells. *J Neurosci* 8, 715-721.
- Krammer, P.H., 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Gelfand, E.W., Brodie, C., 2002. NGF rescues human B lymphocytes from anti-IgM induced apoptosis by activation of PKC ζ . *Eur J Immunol* 32, 136-143.
- Krueger, A., Fas, S.C., Baumann, S., Krammer, P.H., 2003. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 193, 58-69.
- Kruse, N., Cetin, S., Chan, A., Gold, R., Luhder, F., 2007. Differential expression of BDNF mRNA splice variants in mouse brain and immune cells. *J Neuroimmunol* 182, 13-21.
- Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., Bruck, W., 2002. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202-2212.
- Kuhlmann, T., Remington, L., Cognet, I., Bourbonniere, L., Zehntner, S., Guilhot, F., Herman, A., Guay-Giroux, A., Antel, J.P., Owens, T., Gauchat, J.F., 2006. Continued administration of ciliary neurotrophic factor protects mice from inflammatory pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 169, 584-598.
- Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., Karlsson, S., 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 770-774.
- Labouyrie, E., Parrens, M., de Mascarel, A., Bloch, B., Merlio, J.P., 1997. Distribution of NGF receptors in normal and pathologic human lymphoid tissues. *J Neuroimmunol* 77, 161-173.
- Lamballe, F., Klein, R., Barbacid, M., 1991. *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967-979.
- Lambiase, A., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S., Starace, G., D'Elia, M.M., De Carli, M., Aloe, L., 1997. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol* 100, 408-414.

- Lassmann, H., Bruck, W., Lucchinetti, C., 2001. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7, 115-121.
- Laurenzi, M.A., Barbany, G., Timmusk, T., Lindgren, J.A., Persson, H., 1994. Expression of mRNA encoding neurotrophins and neurotrophin receptors in rat thymus, spleen tissue and immunocompetent cells. Regulation of neurotrophin-4 mRNA expression by mitogens and leukotriene B4. *Eur J Biochem* 223, 733-741.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., Hempstead, B.L., 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945-1948.
- Levi-Montalcini, R., 1952. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 55, 330-344.
- Lewin, G.R., Barde, Y.A., 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19, 289-317.
- Li, G.L., Farooque, M., Holtz, A., Olsson, Y., 1995. Changes of beta-amyloid precursor protein after compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using immunohistochemistry. *J Neurotrauma* 12, 269-277.
- Li, W., Maeda, Y., Yuan, R.R., Elkabes, S., Cook, S., Dowling, P., 2004. Beneficial effect of erythropoietin on experimental allergic encephalomyelitis. *Ann Neurol* 56, 767-777.
- Lindquist, S., Schott, B.H., Ban, M., Compston, D.A., Sawcer, S., Sailer, M., 2005. The BDNF-Val66Met polymorphism: implications for susceptibility to multiple sclerosis and severity of disease. *J Neuroimmunol* 167, 183-185.
- Linker, R.A., Maurer, M., Gaupp, S., Martini, R., Holtmann, B., Giess, R., Rieckmann, P., Lassmann, H., Toyka, K.V., Sendtner, M., Gold, R., 2002. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med* 8, 620-624.
- Linker, R.A., Rott, E., Hofstetter, H.H., Hanke, T., Toyka, K.V., Gold, R., 2005. EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses. *Neurobiol Dis* 19, 218-228.
- Linnarsson, S., Bjorklund, A., Ernfors, P., 1997. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci* 9, 2581-2587.
- Liu, Q.R., Lu, L., Zhu, X.G., Gong, J.P., Shaham, Y., Uhl, G.R., 2006. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res* 1067, 1-12.
- Liu, Q.R., Walther, D., Drgon, T., Polesskaya, O., Lesnick, T.G., Strain, K.J., de Andrade, M., Bower, J.H., Maraganore, D.M., Uhl, G.R., 2005. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 134B, 93-103.
- Lo, A.C., Saab, C.Y., Black, J.A., Waxman, S.G., 2003. Phenytoin protects spinal cord axons and preserves axonal conduction and neurological function in a model of neuroinflammation in vivo. *J Neurophysiol* 90, 3566-3571.
- Lomen-Hoerth, C., Shooter, E.M., 1995. Widespread neurotrophin receptor expression in the immune system and other nonneuronal rat tissues. *J Neurochem* 64, 1780-1789.
- Lou, H., Kim, S.K., Zaitsev, E., Snell, C.R., Lu, B., Loh, Y.P., 2005. Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. *Neuron* 45, 245-255.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C., 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15, 323-350.
- Maisonpierre, P.C., Le Beau, M.M., Espinosa, R., 3rd, Ip, N.Y., Belluscio, L., de la Monte, S.M., Squinto, S., Furth, M.E., Yancopoulos, G.D., 1991. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* 10, 558-568.

- Makar, T.K., Bever, C.T., Singh, I.S., Royal, W., Sahu, S.N., Sura, T.P., Sultana, S., Sura, K.T., Patel, N., Dhib-Jalbut, S., Trisler, D., 2009. Brain-derived neurotrophic factor gene delivery in an animal model of multiple sclerosis using bone marrow stem cells as a vehicle. *J Neuroimmunol* 210, 40-51.
- Makar, T.K., Trisler, D., Sura, K.T., Sultana, S., Patel, N., Bever, C.T., 2008. Brain derived neurotrophic factor treatment reduces inflammation and apoptosis in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 270, 70-76.
- Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., Rudensky, A.Y., 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201, 1061-1067.
- Markus, A., Patel, T.D., Snider, W.D., 2002. Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 12, 523-531.
- Maroder, M., Bellavia, D., Meco, D., Napolitano, M., Stigliano, A., Alesse, E., Vacca, A., Giannini, G., Frati, L., Gulino, A., Screpanti, I., 1996. Expression of trkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival. *J Immunol* 157, 2864-2872.
- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., Sun, Y.E., 2003. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302, 890-893.
- Matsumoto, T., Rauskolb, S., Polack, M., Klose, J., Kolbeck, R., Korte, M., Barde, Y.A., 2008. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci* 11, 131-133.
- McMahon, E.J., Bailey, S.L., Castenada, C.V., Waldner, H., Miller, S.D., 2005. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* 11, 335-339.
- McTigue, D.M., Horner, P.J., Stokes, B.T., Gage, F.H., 1998. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci* 18, 5354-5365.
- Medana, I., Martinic, M.A., Wekerle, H., Neumann, H., 2001. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 159, 809-815.
- Meldolesi, J., Sciorati, C., Clementi, E., 2000. The p75 receptor: first insights into the transduction mechanisms leading to either cell death or survival. *Trends Pharmacol Sci* 21, 242-243.
- Merrill, J.E., Kono, D.H., Clayton, J., Ando, D.G., Hinton, D.R., Hofman, F.M., 1992. Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 574-578.
- Meyer-Franke, A., Wilkinson, G.A., Kruttgen, A., Hu, M., Munro, E., Hanson, M.G., Jr., Reichardt, L.F., Barres, B.A., 1998. Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21, 681-693.
- Michalski, B., Fahnstock, M., 2003. Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 111, 148-154.
- Miller, F.D., Kaplan, D.R., 2001. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 58, 1045-1053.
- Mitsumoto, H., Ikeda, K., Klinkosz, B., Cedarbaum, J.M., Wong, V., Lindsay, R.M., 1994. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science* 265, 1107-1110.
- Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I.R., Schwartz, M., 2000. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J Autoimmun* 15, 331-345.

- Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I.R., Schwartz, M., 1999. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5, 49-55.
- Morgan, M.E., Suttmuller, R.P., Witteveen, H.J., van Duivenvoorde, L.M., Zanelli, E., Melief, C.J., Snijders, A., Offringa, R., de Vries, R.R., Toes, R.E., 2003. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 1452-1460.
- Muhallab, S., Lundberg, C., Gielen, A.W., Lidman, O., Svenningsson, A., Piehl, F., Olsson, T., 2002. Differential expression of neurotrophic factors and inflammatory cytokines by myelin basic protein-specific and other recruited T cells infiltrating the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* 55, 264-273.
- Nakajima, K., Honda, S., Tohyama, Y., Imai, Y., Kohsaka, S., Kurihara, T., 2001. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res* 65, 322-331.
- Neumann, H., Misgeld, T., Matsumuro, K., Wekerle, H., 1998. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5779-5784.
- Niino, M., Bodner, C., Simard, M.L., Alatab, S., Gano, D., Kim, H.J., Trigueiro, M., Racicot, D., Guerette, C., Antel, J.P., Fournier, A., Grand'Maison, F., Bar-Or, A., 2006. Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 59, 748-754.
- Nilsson, A.S., Fainzilber, M., Falck, P., Ibanez, C.F., 1998. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett* 424, 285-290.
- Noseworthy, J.H., Gold, R., Hartung, H.P., 1999. Treatment of multiple sclerosis: recent trials and future perspectives. *Curr Opin Neurol* 12, 279-293.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938-952.
- Nye, S.H., Squinto, S.P., Glass, D.J., Stitt, T.N., Hantzopoulos, P., Macchi, M.J., Lindsay, N.S., Ip, N.Y., Yancopoulos, G.D., 1992. K-252a and staurosporine selectively block autophosphorylation of neurotrophin receptors and neurotrophin-mediated responses. *Mol Biol Cell* 3, 677-686.
- Oemichen, M., 1978. Mononuclear phagocytes in the central nervous system. Origin, mode of distribution, and function of progressive microglia, perivascular cells of intracerebral vessels, free subarachnoidal cells, and epilexus cells. *Schriftenr Neurol* 21, I-X, 1-167.
- Olerup, O., Hillert, J., 1991. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38, 1-15.
- Oppenheim, R.W., Prevette, D., Yin, Q.W., Collins, F., MacDonald, J., 1991. Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* 251, 1616-1618.
- Parrens, M., Dubus, P., Groppi, A., Velly, J.F., Labouyrie, E., de Mascarel, A., Merlio, J.P., 1999. Differential expression of NGF receptors in human thymic epithelial tumors. *Pathol Res Pract* 195, 549-553.
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E.J., Fahnstock, M., 2005. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 93, 1412-1421.
- Perez-Perez, M., Esteban, I., Garcia-Suarez, O., Hannestad, J., Naves, F.J., Vega, J.A., 1999. Expression of the neurotrophin receptor TrkB in rat spleen macrophages. *Cell Tissue Res* 298, 75-84.
- Perez-Perez, M., Garcia-Suarez, O., Esteban, I., Germana, A., Farinas, I., Naves, F.J., Vega, J.A., 2003. p75NTR in the spleen: age-dependent changes, effect of NGF and 4-

- methylcatechol treatment, and structural changes in p75NTR-deficient mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 270, 117-128.
- Pershadsingh, H.A., Heneka, M.T., Saini, R., Amin, N.M., Broeske, D.J., Feinstein, D.L., 2004. Effect of pioglitazone treatment in a patient with secondary multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 1, 3.
- Pesini, P., Kopp, J., Wong, H., Walsh, J.H., Grant, G., Hokfelt, T., 1999. An immunohistochemical marker for Wallerian degeneration of fibers in the central and peripheral nervous system. *Brain Res* 828, 41-59.
- Phillips, H.S., Hains, J.M., Armanini, M., Laramée, G.R., Johnson, S.A., Winslow, J.W., 1991. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7, 695-702.
- Piccirillo, C.A., Tritt, M., Sgouroudis, E., Albanese, A., Pyzik, M., Hay, V., 2005. Control of type 1 autoimmune diabetes by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in neonatal NOD mice. *Ann N Y Acad Sci* 1051, 72-87.
- Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 899-910.
- Porritt, M.J., Batchelor, P.E., Howells, D.W., 2005. Inhibiting BDNF expression by antisense oligonucleotide infusion causes loss of nigral dopaminergic neurons. *Exp Neurol* 192, 226-234.
- Purves, D., Snider, W.D., Voyvodic, J.T., 1988. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 336, 123-128.
- Ransohoff, R.M., 2005. Natalizumab and PML. *Nat Neurosci* 8, 1275.
- Redford, E.J., Kapoor, R., Smith, K.J., 1997. Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain* 120 (Pt 12), 2149-2157.
- Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R.M., Jaenisch, R., 2001. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol* 15, 1748-1757.
- Robinson, R.C., Radziejewski, C., Stuart, D.I., Jones, E.Y., 1995. Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry* 34, 4139-4146.
- Rosa, A., Cuesta, M.J., Fatjo-Vilas, M., Peralta, V., Zarzuela, A., Fananas, L., 2006. The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene is associated with risk for psychosis: evidence from a family-based association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B, 135-138.
- Rose, C.R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K.W., Konnerth, A., 2003. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426, 74-78.
- Roux, P.P., Barker, P.A., 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67, 203-233.
- Ruddle, N.H., Bergman, C.M., McGrath, K.M., Lingenheld, E.G., Grunnet, M.L., Padula, S.J., Clark, R.B., 1990. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 172, 1193-1200.
- Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6, 345-352.
- Santambrogio, L., Benedetti, M., Chao, M.V., Muzaffar, R., Kulig, K., Gabellini, N., Hochwald, G., 1994. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol* 153, 4488-4495.

- Sariola, H., 2001. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci* 58, 1061-1066.
- Schenone, A., Gill, J.S., Zacharias, D.A., Windebank, A.J., 1996. Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes. *J Neuroimmunol* 64, 141-149.
- Schuhmann, B., Dietrich, A., Sel, S., Hahn, C., Klingenspor, M., Lommatzsch, M., Gudermann, T., Braun, A., Renz, H., Nockher, W.A., 2005. A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol* 163, 15-23.
- Schwartz, M., Kipnis, J., 2001. Protective autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries. *Trends Mol Med* 7, 252-258.
- Schwartz, M., Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Cohen, I.R., 1999. Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci* 22, 295-299.
- Screpanti, I., Meco, D., Scarpa, S., Morrone, S., Frati, L., Gulino, A., Modesti, A., 1992. Neuromodulatory loop mediated by nerve growth factor and interleukin 6 in thymic stromal cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3209-3212.
- Sendtner, M., Kreutzberg, G.W., Thoenen, H., 1990. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345, 440-441.
- Sendtner, M., Schmalbruch, H., Stockli, K.A., Carroll, P., Kreutzberg, G.W., Thoenen, H., 1992. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature* 358, 502-504.
- Serpe, C.J., Coers, S., Sanders, V.M., Jones, K.J., 2003. CD4+ T, but not CD8+ or B, lymphocytes mediate facial motoneuron survival after facial nerve transection. *Brain Behav Immun* 17, 393-402.
- Shibayama, E., Koizumi, H., 1996. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol* 148, 1807-1818.
- Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., et al., 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693-699.
- Shults, C.W., Kimber, T., Altar, C.A., 1995. BDNF attenuates the effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroreport* 6, 1109-1112.
- Sleeman, M.W., Anderson, K.D., Lambert, P.D., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., 2000. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* 74, 265-272.
- Smith, K.J., Kapoor, R., Hall, S.M., Davies, M., 2001. Electrically active axons degenerate when exposed to nitric oxide. *Ann Neurol* 49, 470-476.
- Sospedra, M., Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23, 683-747.
- Stadelmann, C., Albert, M., Wegner, C., Bruck, W., 2008. Cortical pathology in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 21, 229-234.
- Stadelmann, C., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., Bruck, W., Hohlfeld, R., Lassmann, H., 2002. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 125, 75-85.
- Stankoff, B., Aigrot, M.S., Noel, F., Wattilliaux, A., Zalc, B., Lubetzki, C., 2002. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J Neurosci* 22, 9221-9227.
- Stockli, K.A., Lillien, L.E., Naher-Noe, M., Breitfeld, G., Hughes, R.A., Raff, M.C., Thoenen, H., Sendtner, M., 1991. Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol* 115, 447-459.

- Stockli, K.A., Lottspeich, F., Sendtner, M., Masiakowski, P., Carroll, P., Gotz, R., Lindholm, D., Thoenen, H., 1989. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342, 920-923.
- Storer, P.D., Xu, J., Chavis, J., Drew, P.D., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit the activation of microglia and astrocytes: implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 161, 113-122.
- Strasser, A., 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5, 189-200.
- Tachibana, K., Nakajima, T., Sato, A., Igarashi, K., Shida, H., Iizasa, H., Yoshida, N., Yoshie, O., Kishimoto, T., Nagasawa, T., 1997. CXCR4/fusin is not a species-specific barrier in murine cells for HIV-1 entry. *J Exp Med* 185, 1865-1870.
- Tao, X., West, A.E., Chen, W.G., Corfas, G., Greenberg, M.E., 2002. A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron* 33, 383-395.
- Tapley, P., Lamballe, F., Barbacid, M., 1992. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7, 371-381.
- Tessarollo, L., 1998. Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 125-137.
- Testi, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P.P., Santoni, A., 1990. CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *J Exp Med* 172, 701-707.
- Thoenen, H., Sendtner, M., 2002. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 5 Suppl, 1046-1050.
- Timmusk, T., Belluardo, N., Metsis, M., Persson, H., 1993. Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Neurosci* 5, 605-613.
- Timmusk, T., Palm, K., Lendahl, U., Metsis, M., 1999. Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restrictive silencer element. *J Biol Chem* 274, 1078-1084.
- Torcia, M., Bracci-Laudiero, L., Lucibello, M., Nencioni, L., Labardi, D., Rubartelli, A., Cozzolino, F., Aloe, L., Garaci, E., 1996. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 85, 345-356.
- Turrini, P., Zaccaria, M.L., Aloe, L., 2001. Presence and possible functional role of nerve growth factor in the thymus. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47, 55-64.
- Vega, J.A., Garcia-Suarez, O., Hannestad, J., Perez-Perez, M., Germana, A., 2003. Neurotrophins and the immune system. *J Anat* 203, 1-19.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., Stockinger, B., 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., Stockinger, B., 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9, 1341-1346.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., Hafler, D.A., 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199, 971-979.
- Villoslada, P., Hauser, S.L., Bartke, I., Unger, J., Heald, N., Rosenberg, D., Cheung, S.W., Mobley, W.C., Fisher, S., Genain, C.P., 2000. Human nerve growth factor protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance

- of T helper cell type 1 and 2 cytokines within the central nervous system. *J Exp Med* 191, 1799-1806.
- von Boehmer, H., 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6, 338-344.
- Wang, S., Bray, P., McCaffrey, T., March, K., Hempstead, B.L., Kraemer, R., 2000. p75(NTR) mediates neurotrophin-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 157, 1247-1258.
- Wardle, R.A., Poo, M.M., 2003. Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. *J Neurosci* 23, 8722-8732.
- Wiese, S., Metzger, F., Holtmann, B., Sendtner, M., 1999. The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur J Neurosci* 11, 1668-1676.
- Wiese, S., Pei, G., Karch, C., Troppmair, J., Holtmann, B., Rapp, U.R., Sendtner, M., 2001. Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat Neurosci* 4, 137-142.
- Wiesmann, C., de Vos, A.M., 2001. Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 58, 748-759.
- Winblad, B., Messamore, E., O'Neill, C., Cowburn, R., 1993. Biochemical pathology and treatment strategies in Alzheimer's disease: emphasis on the cholinergic system. *Acta Neurol Scand Suppl* 149, 4-6.
- Yam, P.S., Takasago, T., Dewar, D., Graham, D.I., McCulloch, J., 1997. Amyloid precursor protein accumulates in white matter at the margin of a focal ischaemic lesion. *Brain Res* 760, 150-157.
- Yamamoto, M., Sobue, G., Yamamoto, K., Terao, S., Mitsuma, T., 1996. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res* 21, 929-938.
- Yan, Q., Elliott, J., Snider, W.D., 1992. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature* 360, 753-755.
- Yoles, E., Hauben, E., Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., Kuchroo, V., Cohen, I.R., Weiner, H., Schwartz, M., 2001. Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci* 21, 3740-3748.
- Yoon, S., Lee, H.W., Baek, S.Y., Kim, B.S., Kim, J.B., Lee, S.A., 2003. Upregulation of TrkA neurotrophin receptor expression in the thymic subcapsular, paraseptal, perivascular, and cortical epithelial cells during thymus regeneration. *Histochem Cell Biol* 119, 55-68.
- Ziemssen, T., Kumpfel, T., Klinkert, W.E., Neuhaus, O., Hohlfeld, R., 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, 2381-2391.
- Zivadnov, R., Weinstock-Guttman, B., Benedict, R., Tamano-Blanco, M., Hussein, S., Abdelrahman, N., Durfee, J., Ramanathan, M., 2007. Preservation of gray matter volume in multiple sclerosis patients with the Met allele of the rs6265 (Val66Met) SNP of brain-derived neurotrophic factor. *Hum Mol Genet* 16, 2659-2668.
- Zou, L.P., Abbas, N., Volkmann, I., Nennesmo, I., Levi, M., Wahren, B., Winblad, B., Hedlund, G., Zhu, J., 2002. Suppression of experimental autoimmune neuritis by ABR-215062 is associated with altered Th1/Th2 balance and inhibited migration of inflammatory cells into the peripheral nerve tissue. *Neuropharmacology* 42, 731-739.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
×	mal
α	alpha
Abb.	Abbildung
AB Komplex	Avidin-Biotin Komplex
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
APP	Amyloid Vorläuferprotein
AS	Aminosäure
β	beta
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CFA	Komplette Freundesche Adjuvant
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Con A	Concanvalin A
ConAÜ	Concanvalin A Überstand
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte associated protein 4
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
Cy5	Cyanine 5
d	destilliert
DAB	Diaminbenzodin

dATP	3'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	3'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dGTP	3'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	3'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
Epo	Erythropoetin
et al.	et alteri (und andere)
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
Gy	Gray
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HEK	Humane Embryonale Nierenzellen
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
i.v.	intra venös
JAK	Janus Kinase

Kap.	Kapitel
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria Bertani
LFA-1	leukocyte function associated antigen 1
LIFR β	Leukemia inhibitory factor receptor beta
LPS	Lipopolysaccharid
μ	Mikro
MACS	magnetic bead-activated cell sorting
MAG	Myelin assoziiertes Protein
mBDNF	murine brain derived neurotrophic factor
MBP	Myelinbasisches Protein
μ Ci	Mikrocurie
MHC	major histocompatibility complex
Min	Minuten
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	Millimol
MOG	Myelinoligodenrozytenprotein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl der Messwerte
Na _v	Natriumkanal
NF κ B	nuklear factor kappaB
ng	Nanogramm
NGF	nerve growth factor
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NT/NTR	Neurotrophin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin

PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLP	Proteolipidprotein
PMA	phorbol mystrate acetate
PML	progressive multifokale Leukoenzephalopathie
PNS	Peripheres Nervensystem
POD	Peroxidase
PPAR γ	Peroxisomproliferationsaktivierter Rezeptor gamma
pTrkB	phosphorylierte Tyrosin Kinase B
ReMed	Restimulationsmedium
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TCGF	T cell growth factor
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Trk	Tyrosinkinase
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
TZR	T-Zellrezeptor
VLA-4	very late antigen 4
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Maus BDNF Genstruktur und <i>Splice</i> -Varianten	13
Abbildung 4.1:	Amplifikation der mBDNF mRNA <i>Splice</i> -Varianten im Gehirn von C57BL/6 Mäusen	59
Abbildung 4.2:	Durchschnittliche relative Expression der mBDNF mRNA <i>Splice</i> -Varianten im Gehirn von C57BL/6 Mäusen	60
Abbildung 4.3:	Durchschnittliche relative Expression der mBDNF 3 mRNA in peripherem lymphatischem Gewebe und Immunzellpopulationen in C57BL/6 Mäusen	61
Abbildung 4.4:	Durchschnittliche relative Expression der mBDNF 3 mRNA	63
Abbildung 4.5:	Durchschnittliche relative Expression der mBDNF mRNA <i>Splice</i> -Varianten in Astrozyten von C57BL/6 Mäusen	64
Abbildung 4.6:	Durchschnittliche relative Expression der mBDNF mRNA <i>Splice</i> -Varianten in Astrozyten im Vergleich zum Gesamthirn von C57BL/6 Mäusen	65
Abbildung 4.7:	Durchschnittliche relative Expression der mBDNF 3 mRNA <i>Splice</i> -Varianten in gereinigten Astrozyten und Mikroglia von C57BL/6 Mäusen	66
Abbildung 4.8:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	68
Abbildung 4.9:	Restriktionsverdau lentiviraler Vektoren	69
Abbildung 4.10:	Austestung des lentiviralen BDNF Vektors sowie des BDNF Virus an HEK-Zellen	70
Abbildung 4.11:	Lentivirale Transduktion von T-Zellen einer MOG-spezifischen Zelllinie	71
Abbildung 4.12:	Lentivirale Transduktion mit dem GFP Virus	72
Abbildung 4.13:	BDNF Cytospins unbehandelter und lentiviral transduzierter T-Zellen	73
Abbildung 4.14:	BDNF Bioaktivitätstest mittels Überlebensassay mit murinen dorsalen Wurzelganglien	75
Abbildung 4.15:	Detektion der GFP positiven T-Zellen in der Peripherie nach i.v. Injektion in C57BL/6 Mäusen	76
Abbildung 4.16:	Nachweis der GFP positiven T-Zellen im ZNS nach i.v. Injektion in C57BL/6 Mäusen	77

Abbildung 4.17: EAE Krankheitsverlauf i.v. injizierter und MOG ₃₅₋₅₅ immunisierter C57BL/6 Mäuse	80
Abbildung 4.18: Immunhistochemische Auswertung von Immunzellinfiltraten in C57BL/6 Mäusen nach i.v. Injektion	80
Abbildung 4.19: Immunhistochemische Auswertung von axonalen Dichten und APP Akkumulationen in C57BL/6 Mäusen nach i.v. Injektion	82
Abbildung 4.20: Immunhistochemische Auswertung der iNOS Expression in C57BL/6 Mäusen nach i.v. Injektion	83
Abbildung 4.21: Funktionelle Relevanz der BDNF Überexpression <i>in situ</i> anhand Fluoreszenzmikroskopischer Analyse der pTrkB Färbung	84
Abbildung 4.22: FACS Analyse der Aktivierungsmarker applizierter BDNF und GFP Virus transduzierter T-Zellen im Vergleich zu endogenen T-Zellen	88

8.3 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralf Gold dafür danken, dass er es mir ermöglicht hat diese Arbeit am Multiple Sklerose Institut in Göttingen anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Fred Lühder für seine stete Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und ausgezeichneten Betreuung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Ernst Wimmer für die Übernahme der Erstkorrektur, sowie bei Herrn Prof. Dr. Detlef Doenecke, der bereit war, die Zweitkorrektur dieser Arbeit zu übernehmen.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. Ralf Linker und Dr. Niels Kruse für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und hilfreichen wissenschaftlichen Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Harald Neumann danke ich für die Bereitstellung des lentiviralen Vektors und Frau Dr. Ellen Gerhardt für die Generierung der Lentiviren und die überaus aufmunternden Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Stefan Wiese danke ich für Hilfe beim Überlebensassay.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an alle jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter des IMSF für die tolle Arbeitsatmosphäre, die gute Stimmung, die Hilfsbereitschaft und die technische Unterstützung.

Mein Dank gilt außerdem meiner Familie, die mich immer unterstützt haben und immer für den nötigen Ausgleich während meiner Doktorarbeit gesorgt haben.

Ganz besonders danke ich meinem Ehemann dafür, dass er mein Leben stets bereichert und mir immer zur Seite steht.

8.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe in keinem früheren Verfahren einen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Göttingen, den 15-03-2010

Seray Demir

8.5 Lebenslauf

Name	Seray Demir, geb. Cetin
Geburtstag	07. Mai 1980
Geburtsort	Rotenburg a.d. Fulda
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schule	1986 – 1996: Grundschule und gymnasiale Mittelstufe, Brüder-Grimm-Schule, Bebra 1996 – 1999: Gymnasiale Oberstufe, Jakob-Grimm-Schule, Rotenburg a.d. Fulda Abschluss: Abitur
Studium und Promotion	1999 – 2005: Studium der Diplom-Biologie an der Universität Kassel Vordiplom 2002 Diplom 2005 Schwerpunkte: Genetik, Zellbiologie, Tierphysiologie Thema der Diplomarbeit: „Molekulargenetische Analyse testikulär exprimierter olfaktorischer Rezeptoren“ am Deutschen Primatenzentrum, Abt. Primatengenetik, Göttingen Ab 2006 Promotion am Multiple Sklerose Institut in Göttingen Thema der Doktorarbeit: „ <i>Brain derived neurotrophic factor</i> (BDNF) – Untersuchungen zur Expression und Regulation <i>in vitro</i> sowie zur funktionellen Relevanz in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)“